

**Aus dem Institut für Pharmakologie im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein,
Campus Kiel an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
(Direktor: Prof Dr. med. Cascorbi)**

**Der Vergleich zwischen früher und verzögerter systemischer
Behandlung von Ratten nach ischämischem Schlaganfall mit
Candesartan**

**Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel**

vorgelegt von

**Friederike Hagemann
aus Bremen**

Kiel, 2010

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Peter Gohlke
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. G. Kuhlenbäumer
Tag der mündlichen Prüfung: 24.08.2010
Zum Druck genehmigt, Kiel den, 24.08.2010

gez. Priv. Doz. Dr. Juraj Culman
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

1. EINLEITUNG.....	5
1.1. DAS RENIN-ANGIOTENSIN SYSTEM.....	5
1.1.1. Das periphere Renin-Angiotensin System	5
1.1.2. Das Renin-Angiotensin System im Gehirn	7
1.2. DIE PATHOGENESE DES SCHLAGANFALLS UND BEDEUTUNG DES RAS BEIM SCHLAGANFALL	8
1.3. DER AT ₁ -REZEPTORANTAGONIST CANDESARTAN	8
1.4. AT ₁ -REZEPTORANTAGONISTEN UND NEUROPROTEKTION	9
1.5. FRAGESTELLUNG.....	10
2. MATERIAL UND METHODEN	11
2.1. ANSATZ DER LÖSUNGEN UND REAGENZIEN	11
2.1.1. Lösungen und Reagenzien für Immunhistochemie und Perfusion.....	11
2.2. TIERE.....	12
2.3. OPERATIVE EINGRIFFE	12
2.3.1. Anfertigung und Implantation des Arteria femoralis Katheters.....	12
2.3.2. Modell der fokalen Hirnischämie mit Reperfusion	14
2.3.2.1. Herstellung des okkludierenden Fadens	14
2.3.2.2. Anästhesie und Operation	14
2.3.2.3. Überwachung des regionalen zerebralen Blutflusses mit der Laser-Doppler Flussmessung.....	14
2.3.2.4. Blutparameter.....	15
2.4. MESSUNG VON BLUTDRUCK UND HERZFREQUENZ	15
2.5. EVALUATION DES NEUROLOGISCHEN DEFIZITS	15
2.5.1. Die Messskala nach Bederson et al. (1986)	16
2.5.2. Messskala nach Garcia et al. (1995).....	16
2.6. BEHANDLUNGSPROTOKOLL.....	17
2.7. GEHIRNENTNAHME.....	18
2.8. BESTIMMUNG DES INFARKTVOLUMENS (CRYSYL VIOLETT-FÄRBUNG)	19
2.9. IMMUNHISTOCHEMIE.....	20
2.9.1. "TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling" TUNEL Färbung.....	20
2.9.2. Färbung aktivierter Mikroglia und Makrophagen.....	20

2.10. STATISTISCHE AUSWERTUNG	21
3. ERGEBNISSE.....	22
3.1. DER REGIONALE ZEREBRALE BLUTFLUSS.....	22
3.2. MITTLERER ARTERIELLER BLUTDRUCK, HERZFREQUENZ UND BLUTPARAMETER	23
3.3. NEUROLOGISCHES DEFIZIT NACH SCHLAGANFALL	24
3.4. INFARKTVOLUMEN	28
3.5. DAS HIRNÖDEM.....	29
3.6. IMMUNHISTOCHEMISCHE DETEKTION VON APOPTOSE UND INFLAMMATORISCHER ANTWORT.....	29
3.6.1. Detektion apoptotischer Prozesse mittels "TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling" TUNEL ..	29
3.6.2. Detektion antiinflammatorischer Prozesse mit Hilfe ED-1 positiver Zellen (aktivierte Mikroglia und Makrophagen)	31
4. DISKUSSION.....	33
4.1. TIEREXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN.....	33
4.1.1. Prävention des Schlaganfalls durch systemische Behandlung mit AT_1 -Rezeptorantagonisten	33
4.1.2. Prävention des Schlaganfalls durch Blockade der AT_1 -Rezeptoren im Gehirn	36
4.1.3. Akute Behandlung des Schlaganfalls mit AT_1 -Rezeptorantagonisten	36
4.1.4. Neuroprotektive Wirkung der AT_1 -Rezeptorantagonisten im Gehirn	38
4.2. KLINISCHE STUDIEN ZUR PRÄVENTION UND BEHANDLUNG DES SCHLAGANFALLS	40
5. ZUSAMMENFASSUNG	43
6. LITERATURVERZEICHNIS.....	45
7. ABKÜRZUNGEN	53
8. DANKSAGUNG	55
9. LEBENS LAUF	57

1. Einleitung

1.1. Das Renin-Angiotensin System

1.1.1. Das periphere Renin-Angiotensin System

Das Renin-Angiotensin System (RAS) ist zuständig für die Aufrechterhaltung des Blutdruckes, des Elektrolythaushaltes sowie des Wasserhaushaltes des Körpers. Am Anfang der Renin-Angiotensin-Aldosteron-Kaskade steht die Freisetzung des Hormons Renin. Renin ist eine Protease, die hauptsächlich in den juxtaglomerulären Zellen der Niere gebildet wird und nach u.a. sympathischer Stimulation sowie bei vermindertem Blutvolumen freigesetzt wird. Die Bildung von Renin wird durch Angiotensin II (ANG II) im Sinne einer negativen Rückkopplung gehemmt. Renin spaltet vom Glykoprotein Angiotensinogen, welches überwiegend in der Leber synthetisiert wird, das Dekapeptid Angiotensin I (ANG I) ab. ANG I ist selbst Ausgangsprodukt für die Bildung von ANG II, welches unter der Wirkung von Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) durch Abspaltung von zwei Aminosäuren aus ANG I entsteht. Die Effekte des RAS werden durch die Bindung des ANG II an Angiotensinrezeptoren Typ 1 (AT₁-Rezeptor) und Typ 2 (AT₂-Rezeptor) vermittelt (Abb. 1).

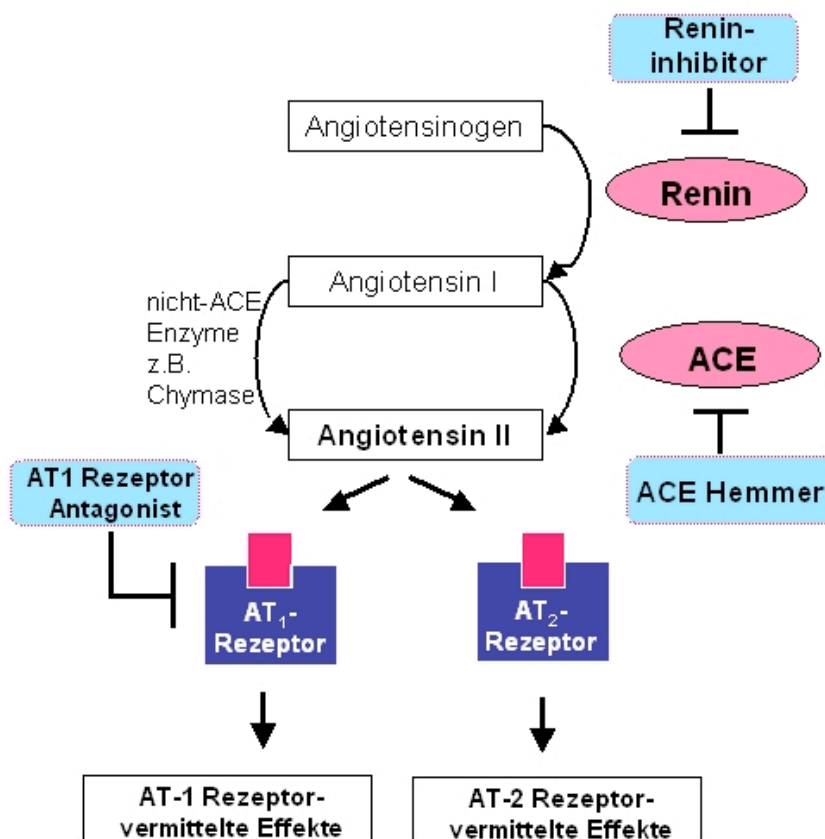


Abb.1 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

AT₁- und AT₂-Rezeptoren haben ein unterschiedliches Verteilungsmuster im Körper (Obermüller et al. 1991, Steckeling et al. 1992b, Stoll et al. 1995a). Im Herzen, in den Nebennieren sowie den Nierenarterien sind beide gleichermaßen vertreten, wohingegen in der Bauchspeicheldrüse, dem Nebennierenmark, dem Uterus und den Granulosazellen der Eierstöcke (Chappell et al. 1992, Simon et al. 1991, Stoll et al. 1995b) sowie im embryonalen Gewebe AT₂-Rezeptoren vorherrschen. Der AT₂-Rezeptor wird im fötalen Gewebe exprimiert und fällt post partum stark ab. Deshalb wird dem AT₂-Rezeptor eine Beteiligung an Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen zugeschrieben (Grady et al. 1991, Tsutsumi et al. 1991).

Die Wirkungen von ANG II am AT₁-Rezeptor sind vielfältig (Abb. 2).

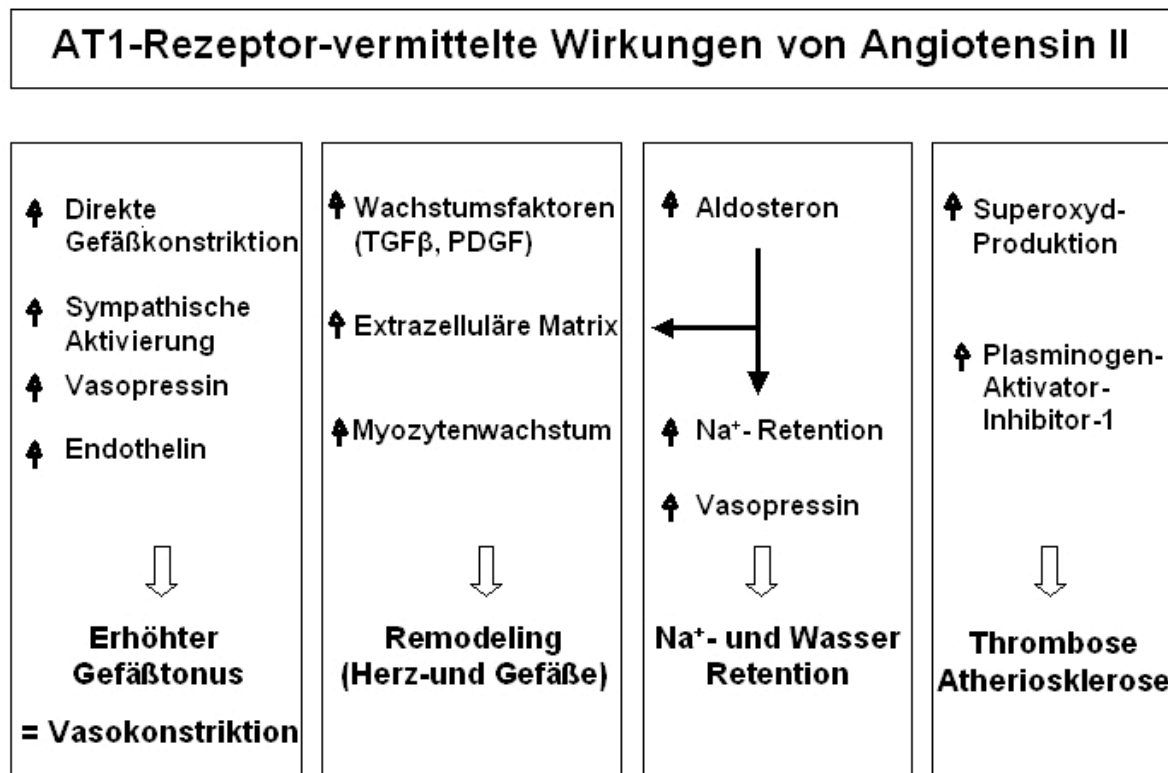


Abb.2 AT₁-Rezeptor-vermittelte Wirkungen von Angiotensin II

Im Bereich der peripheren Arteriolen führt ANG II zu einer Vasokonstriktion durch einen direkten Angriff auf die glatte Gefäßmuskulatur. Die Folge ist eine Erhöhung des peripheren Gefäßwiderstandes und des Blutdruckes. Zudem kann ANG II durch die Aktivierung des Sympathikus die Blutgefäße kontrahieren. ANG II kann über die Stimulation des AT₁-Rezeptors als Wachstumsfaktor fungieren. Auch das „Remodeling“ nach Myokardinfarkt und die Entwicklung einer Nephrosklerose werden durch ANG II mit beeinflusst (Heemann 2007, Falkenhahn et al. 1995, Edling et al. 1995). Durch die Stimulation der Proteinbiosynthese wird die Proliferation von Fibroblasten, Myokardzellen, Zellen des adrenokortikoiden Gewebes, (Berk et al. 1989, Stoll et al. 1995a) sowie im

Bereich der glatten Gefäßmuskulatur gefördert. Es zeigt somit in späteren Phasen der Plaqueprogression eine pro-atherogene Wirkung (Kintscher und Unger 2003).

ANG II steigert die Rückresorption von Natrium in den Nierentubuli. Teilweise ist dies auf eine direkte Wirkung von ANG II auf die Tubuli, teilweise auf die Wirkung von Aldosteron zurückzuführen. Aldosteron wird in der Zona glomerulosa der Nebenniere gebildet und durch ANG II freigesetzt. Natrium ist das wichtigste Ion zur Aufrechterhaltung des intravasalen osmotischen Drucks. Steigt die Natriumkonzentration intravasal, so folgt freies Wasser nach. Das intravasale Volumen nimmt zu, der Blutdruck steigt.

Durch Stimulation der NADH-/NADPH-Oxidase fördert ANG II die Bildung freier Sauerstoffradikale. Dies kann durch eine Störung der Endothelfunktion die Bildung einer Artherosklerose begünstigen (Zhou et al. 2005, Libby 2001, Wolf 2000). Weiterhin wird durch eine Aktivierung des Plasminogen Aktivator Inhibitors-1 über eine verminderte Bildung von Plasmin eine erhöhte Thrombogenität des Epithels begünstigt (Vaughan 2001, Vaughan and Brown 2000).

1.1.2. Das Renin-Angiotensin System im Gehirn

Die Bestandteile des RAS lassen sich auch im Gehirn nachweisen (Übersicht bei Fuxe et al. 1988, Unger et al. 1988). Man findet sie in unterschiedlicher Verteilung.

Angiotensinogen kann vor allem in Astrozyten und Ependymzellen nachgewiesen werden. Renin findet sich in den Nervenendigungen und Neuronen. ACE kommt vor allem im Plexus choroideus, den circumventrikulären Organen (CVO) und den Synaptosomen vor (Übersicht bei Unger et al. 1988). Zu den besonders ANG II-reichen Gebieten zählen der Hypothalamus, das limbische System, die Medulla oblongata und das Rückenmark (Healy und Prinz, 1984). Im Hypothalamus zeigen einige Kerngebiete eine besonders hohe Dichte an ANG II, wie z.B. der Nucleus paraventricularis (PVN), der Nucleus supra-chiasmaticus (SCN), das subfornikale Organ (SFO), der Nucleus tractus solitarius (NTS) und das Organum vasculosum laminae terminalis (OVLT). In den genannten ANG II-reichen Gebieten findet sich auch die höchste Dichte an ANG II-Rezeptoren. Dabei tritt der Subtyp AT₁- häufiger als der AT₂-Rezeptor auf (Song et al. 1992, Steckelings et al. 1992a, Obermüller et al. 1991).

ANG II hat im ZNS als Neurotransmitter oder Neuromodulator eine Vielzahl von Funktionen. Es konnte gezeigt werden, dass ANG II durch Stimulation von AT₁- Rezeptoren im Gehirn den Blutdruck steigert, Arginin-Vasopressin (AVP) in die Blutbahn freisetzt und ein Trinkverhalten auslöst.

AVP ist ein potenter Vasokonstriktor und führt zu einer Erhöhung sowohl des Gefäßwiderstandes als auch des Blutdrucks. Gleichzeitig wird via NTS und RVLM das sympathische Nervensystem aktiviert, was experimentell durch die Gabe von AT₁-Rezeptorantagonisten aufgehoben werden kann (Unger et al. 1985). Vasopressin und der Sympathikus sind beide an dem zentral vermittelten Blutdruckanstieg durch ANG II beteiligt.

1.2. Die Pathogenese des Schlaganfalls und Bedeutung des RAS beim Schlaganfall

Der Schlaganfall ist eine kardiovaskuläre Erkrankung der Blutgefäße, die für die Versorgung des Gehirns mit Sauerstoff und Nährstoffen zuständig sind. Zu einem Schlaganfall kommt es, wenn ein intrazerebrales oder ein gehirnversorgendes Gefäß rupturiert oder verschlossen ist, in der Regel durch einen Thrombus. Es kann zwischen vier verschiedenen Ätiologien des Schlaganfalls unterschieden werden. Die ersten beiden, zerebrale Thrombose und zerebrale Embolie, werden durch eine Okklusion eines Gefäßes verursacht und machen etwa 80 % aller Schlaganfälle aus. Die Subarachnoidalblutung sowie die intrazerebrale Hämorrhagie werden durch eine Blutung verursacht. Eine häufige Ursache hierfür ist ein Aneurysma im Bereich des Gehirns oder eine Verletzung des Kopfes. Sie stellen die Gruppe der hämorrhagischen Schlaganfälle dar. Der Schlaganfall ist in den meisten Industrieländern die dritthäufigste Todesursache nach koronaren Herzerkrankungen und Krebserkrankungen.

Der Schlaganfall ist zudem eine Erkrankung, die zu einer schwerwiegenden und langanhaltenden Beeinträchtigung körperlicher und mentaler Fähigkeiten führen kann.

Neben dem direkt vom Gefäßverschluss betroffenen Areal gibt es den Randbereich des Infarktgebiets, die Penumbra. Sie ist meist größer als das eigentliche Infarktareal und noch durchblutet. Ob dieses Gewebe untergeht, entscheidet sich in einigen Stunden nach dem Schlaganfall. Das Ziel der Schlaganfalltherapie ist unter anderem der Erhalt dieser Penumbra.

Verschiedene experimentelle Tiermodelle für den Schlaganfall ermöglichen es, die Pathophysiologie dieser Erkrankung besser zu verstehen sowie die Effektivität unterschiedlicher Behandlungsmodalitäten zu überprüfen. In unseren Untersuchungen benutzten wir ein Modell für die Okklusion der Arteria cerebri media (MCAO) mit nachfolgender Reperfusion. Dieses Modell wurde von Koizumi et al. (1986) eingeführt und später von Longa et al. (1989) modifiziert. Es ist das am häufigsten in Studien eingesetzte Modell zur Forschung im Bereich der Pathophysiologie und Therapie des Schlaganfalls, da es minimalinvasiv ist und keine Kraniotomie benötigt.

In einer Reihe von Studien, in denen die Folgen eines Schlaganfalls durch die Behandlung mit AT₁-Rezeptorantagonisten oder durch die genetische Veränderung des Angiotensinrezeptors vermindert werden konnten, zeigt sich, welche wichtige Rolle ANG II in der Pathogenese des Schlaganfalls spielt (Dai et al. 1999, Nishimura et al. 2000b, Walther et al. 2002, Groth et al. 2003, Brdon et al. 2007).

1.3. Der AT₁-Rezeptorantagonist Candesartan

Neben Losartan, Valsartan, Eprosartan, Irbesartan, Olmesartan und Telmisartan ist Candesartan (Abb. 3) ein weiterer Vertreter der AT₁-Rezeptorantagonisten, der sogenannten Sartane, und ist für die Behandlung der essentiellen Hypertonie und Herzinsuffizienz zugelassen. Während Losartan eine kompetitive Bindung der AT₁-Rezeptoren mit einer Dissoziationshalbwertszeit von 2,5 Minuten bewirkt, geht Candesartan eine festere Bindung mit dem Rezeptor ein und zeigt eine Dissoziationshalbwertszeit von über einer Stunde sowie bis 16 mg eine dosislineare Wirkung. Klinisch wirkt sich dieser Unterschied darin aus, dass eine einmal tägliche Dosierung von 4 bis 16 mg

Candesartan beim Menschen eine Blutdrucksenkung auf mindestens 80 Prozent des maximalen Wertes über 24 Stunden bewirkt. Es wirkt damit wesentlich länger als Losartan. Bezogen auf die Wirkstärke, sind 8 mg Candesartan vergleichbar mit 5 mg Amlodipin, 10 mg Enalapril oder 50 mg Losartan. Wie die anderen Sartane, zeigt auch Candesartan eine gute Verträglichkeit. Die absolute Bioverfügbarkeit einer peroral applizierten Candesartan-Cilexetil-Lösung beträgt etwa 40 Prozent, die terminale Halbwertszeit fünf bis neun Stunden. Candesartan-Cilexetil ist eine „Prodrug“, die durch Esterhydrolyse in der Darmmucosa zu Candesartan komplett bioverfügbar gemacht wird. Candesartan wird hauptsächlich über den Urin und die Galle ausgeschieden und nur zu einem geringfügigen Anteil durch Verstoffwechselung in der Leber inaktiviert.

Candesartan hat sich in einer Reihe von tierexperimentellen Studien als hochselektiver AT₁-Rezeptorantagonist erwiesen. Nach einer Candesartan i.v. Gabe von 3 mg/kg KG ließen sich zentrale, ANG II-vermittelte Effekte für 24h vollständig blockieren (Gohlke et al. 2002a u. b).

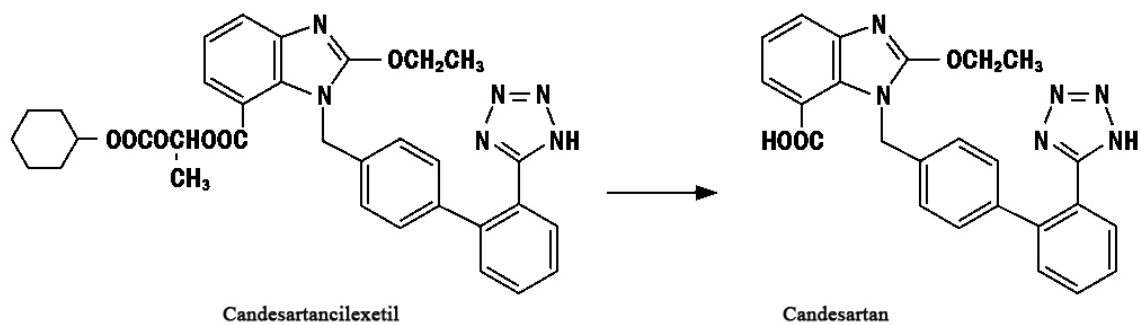


Abb. 3 Chemische Strukturformel von Candesartan-Cilexetil

1.4. AT₁-Rezeptorantagonisten und Neuroprotektion

In verschiedenen tierexperimentellen Studien wurden AT₁-Rezeptorantagonisten erfolgreich für die Therapie des akuten ischämischen Infarktes eingesetzt. Hierbei konnten eine Reihe von Mechanismen aufgezeigt werden, die die neuroprotektive Wirkung der AT₁-Rezeptorantagonisten beim akuten Schlaganfall erklären können. Eine systemische Langzeitbehandlung mit einem AT₁-Rezeptorantagonisten vor einem Schlaganfall hat einen positiven Effekt auf die Morphologie der Blutgefäße und die zerebrale Blutversorgung. Zudem werden eine Verschiebung der zerebrovaskulären Autoregulation auf ein niedriges Druckniveau, antiinflammatorische Effekte in zerebralen Gefäßen sowie die Unterstützung der Angiogenese beobachtet (Nishimura et al. 2000b, Ito et al. 2002, Ando et al. 2004, Forder et al. 2005).

Neben den peripheren Wirkungen des AT₁-Rezeptorantagonisten tragen auch eine Reihe von Effekten, die durch Blockade von AT₁-Rezeptoren im Gehirn vermittelt werden, zu den neuroprotektiven Wirkungen der AT₁-Rezeptorantagonisten bei. Hierzu gehören die Hemmung postischämischer Entzündungen, anti-apoptotische Effekte sowie die Reduktion der Superoxid Produktion in den Neuronen. Zusätzlich kann eine Stimulation der AT₂-Rezeptoren im Gehirn die Genesung nach fokaler zerebraler Ischämie möglicherweise verbessern (Dai et al. 1999, Lou et al. 2004, Li et al. 2005, Sugawara et al. 2005).

1.5. Fragestellung

Ziel der hier vorgelegten Arbeit war es, die Bedeutung einer Blockade von AT₁-Rezeptoren im Gehirn für den neurologischen Status und die Infarktgröße nach einem akuten Schlaganfall zu untersuchen. Damit sollte der Stellenwert der Therapie mit AT₁-Rezeptorantagonisten nach zerebraler Ischämie verdeutlicht werden. Hierzu wurde normotensiven Wistar Ratten mittels MCAO über 1,5 h ein Schlaganfall zugefügt. Es erfolgte die Behandlung mit dem AT₁-Rezeptorantagonisten Candesartan. Eine Hypothese, die untersucht wurde, war, dass eine suffiziente Blockade von AT₁-Rezeptoren im Gehirn ausschlaggebend für das Ausmaß des neurologischen Defizits nach akuter Behandlung ist. Aus diesem Grund wurde eine hohe Dosierung mit 3,0 mg/kg Candesartan subcutan (s.c.) für die Behandlung der Tiere nach einem Schlaganfall gewählt. Mit dieser Dosierung konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass die zentral vermittelten Effekte von ANG II wie Blutdrucksteigerung, Trinkverhalten und AVP-Freisetzung vollständig und über 24 Stunden anhaltend gehemmt werden konnten (Gohlke et al. 2002 a und b). Diese Untersuchungen sollten klären, ob eine langanhaltende Blockade zu einer Reduktion von postischämischer Entzündungsreaktion und Apoptose, einer Verbesserung des neurologischen Status und zu einer Verminderung des Infarktvolumens nach einem ischämischen Schlaganfall führen. Zeigen die AT₁-Rezeptorantagonisten eine antiinflammatorische Wirkung? Dies soll mittels Immunhistochemie untersucht werden. Da aufgrund einer gestörten zerebrovaskulären Autoregulation nach einem Schlaganfall die Hirndurchblutung vom systemischen Blutdruck abhängig ist, könnte ein Blutdruckabfall während der zerebralen Ischämie einen schädigenden Einfluss auf den neurologischen Status haben. Daher wurden die Effekte der hohen Dosierung von Candesartan auf den Blutdruck vor, während und nach einem Schlaganfall gesondert untersucht. Zur Ermittlung des günstigsten Zeitpunkts des Therapiebeginns wurden die Tiere entweder 3 h oder 24 h nach Ischämiebeginn mit Candesartan behandelt.

2. Material und Methoden

2.1. Ansatz der Lösungen und Reagenzien

2.1.1. Lösungen und Reagenzien für Immunhistochemie und Perfusion

10xPB (Phosphat Puffer): 11.5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt, Deutschland), 2 g KH_2PO_4 (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 2 g KCl (Merck, Darmstadt, Deutschland) wurden in 800 ml destilliertem Wasser gelöst. Der pH Wert wurde bei 7,4 eingestellt und ein endgültiges Volumen von 1000 ml durch Zugabe von destilliertem Wasser erreicht.

PBS (Phosphate Buffered Saline/Phosphat gepufferte Salzlösung): 8 g NaCl (Merck, Darmstadt, Deutschland) wurden in 800 ml destilliertem Wasser gelöst. Nach Zugabe von 100 ml PB (10x) Lösung, pH Einstellung bei 7,4 und der Zugabe von destilliertem Wasser wurde ein endgültiges Volumen von 1000 ml erreicht.

PBST: 5 ml Triton X-100 (Merck, Darmstadt, Deutschland) wurden zu 995 ml PBS (1x, pH 7,4) gegeben.

0,2 % Paraformaldehyd Lösung Firma: 20 ml 4% Paraformaldehyd wurden mit 380 ml PBS (1x, pH 7,4) zusammen gegeben und vermischt.

0,1 % Cresylviolett Lösung: 1 g Cresylviolett Acetat (9-Amino-5-imono-5H [α]-phenoxazine acetate salt) (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) wurde zu 1000 ml destilliertem Wasser gegeben, für 2 Tage gerührt und anschließend durch ein Filterpapier gefiltert.

Säure/Ethanol: 100 ml 100 % Essigsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland) wurden zu 900 ml vergälltem 100% Ethanol (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) gegeben und gemischt.

0,1 % Triton X-100 (Merck, Darmstadt, Deutschland) in 0,1 % tri-Natriumcitrat- Dihydrat-Puffer: 1 g tri-Natriumcitrat-Dihydrat (Merck, Darmstadt, Deutschland) wurden in 1000 ml destilliertes Wasser gegeben, hinzu kamen 1 ml Triton X-100 und die Substanzen wurden gemischt.

0,3 % Hydrogen Peroxid: 10 μl 30 % H_2O_2 (Merck, Darmstadt, Deutschland) wurde zu 990 μl Methanol gegeben und gemischt.

3% Hydrogen-Peroxid: 100 μl 30% H_2O_2 wurde zu 900 μl Methanol gegeben und gemischt.

ABC Lösung: VECTASTAIN® *Elite* ABC Reagenz (Vektor, Burlingame, Californien, USA): Zwei Tropfen des Agens A wurden zu 5 ml PBS gegeben. Nach der Zugabe von zwei Tropfen des Agens wurde die Lösung gemischt und war nach 30 min. gebrauchsfertig.

DAB Reagenz: 3,3'-diaminobenzidin Tabletten Set (Sigma, Deisenhofen, Deutschland): jedes Sigma Fast DAB Tabletten Set beinhaltet, wenn es in 5 ml deionisiertem Wasser gelöst ist: D9292 DAB: 0,7 mg/ml; U 1380 Urea Hydrogen Peroxid (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) 0,2 mg/ml und Tris Puffer: 0,06 M.

5% Normal goat serum (NGS) in PBST: 0,5 ml normal goat serum (Vektor, Burlingame, Californien, USA) wurde zu 9,5 ml PBST gegeben und gemischt.

1% Bovine serum albumin (BSA) in PBST: 1 g BSA (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) wurde in 100 ml PBST gelöst und gemischt.

TUNEL Reaktionslösung: 300 µl TUNEL Reaktionslösung enthält: 60 µl 5xTdT Puffer; 12 µl CoCl₂; 6 µl Terminale Transferase (Nukleosid-triphosphat: DNA desoxynukleotidylexotransferase, TdT Enzym) und 222 µl TUNEL Label (Nukelotid Mix, beinhaltet fluorescein-dUTP und dNTP). Alle diese Reagenzien wurden bei Roche Diagnostik GmbH, Mannheim, Deutschland bestellt.

2.2. Tiere

Für die Experimente wurden männliche Wistar Ratten (Charles River, Salzfeld, Deutschland) 217(+/-) 15 g benutzt. Alle Ratten wurden bei konstanter Luftfeuchtigkeit (60+/-5 %) und Temperatur (25+/- °C), sowie einem 12 h Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Sie hatten freien Zugang zu einem Futter (Sniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) und konnten Wasser ad libitum trinken. Diese Studie wurde nach den Richtlinien für Tierexperimente der Universität Kiel durchgeführt und vom Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein (Aktenzeichen V 252-72241.121-22 (82-9/02)) genehmigt.

2.3. Operative Eingriffe

2.3.1. Anfertigung und Implantation des Arteria femoralis Katheters

In ein 5 cm langes PP 10 Schlauchstück wurde zunächst zur Stabilisierung ein Führungsdraht eingeführt. Zusammen mit dem Führungsdraht wurde nun das PP 10 Schlauchstück ca. 3 mm in einen 25 cm langen PP 50 Schlauch hineingeschoben. Über einer Heißluftdüse und unter leichtem Drehen wurden die beiden Schläuche an der Überlappungsstelle miteinander verschweißt. Durch Fingerdruck auf die Schweißstelle entstand eine knotenartige Auftreibung. Vor Beginn der Implantation wurde der Katheter unter Verwendung einer Einmalspritze und entsprechender Kanüle mit NaCl-Heparinlösung gefüllt und seine Dichtigkeit überprüft. Anschließend wurde der PP 10

Schlauch, d.h. der Teil des Katheters, der später in die A. femoralis eingeführt wurde, auf 3,5 cm gekürzt.

Zwei Tage vor MCAO wurde zur Messung des mittleren arteriellen Drucks (MAP) und der Herzfrequenz (HR) ein Polyethylenkatheter (PP-50) über die Arteria femoralis in die Aorta abdominalis auf folgende Weise implantiert:

Zunächst wurden die Ratten mit einer intraperitonealen (i.p.) Injektion von 4 % Chlorhydrat mit einer Dosis von 400 mg/kg (1 ml/100 g Körpergewicht) narkotisiert. Danach erfolgte eine Rasur der rechten Leistenbeuge. Hierzu wurde die Ratte in Rückenlage mit abduzierten Extremitäten gelagert und mit Klebestreifen auf der Unterlage fixiert.

Es wurde ein 10 mm langer Hautschnitt in der rechten Leistenbeuge quer zum Verlauf des Gefäßnervensbündels durchgeführt. Das Gefäßnervensbündel, bestehend aus V. femoralis, A. femoralis und N. femoralis von medial nach lateral gesehen, wurde stumpf freipräpariert. Die A. femoralis wurde dann vorsichtig mit den beiden kleinen, gebogenen, stumpfen Pinzetten aus der Bindegewebsscheide herausgelöst und auf einer Strecke von ca. 15 mm freipräpariert. Es galt dabei die umliegenden Strukturen, besonders den N. femoralis nicht zu verletzen. Der freigelegte Gefäßabschnitt wurde an seinem proximalen und distalen Ende mit einem Baumwollfaden umschlungen und zwischen diesen beiden Fäden aufgespannt. Nun folgte die Ligatur des distalen Endes des Gefäßabschnittes durch das Verknoten des Fadens. Durch Anspannen des proximalen Fadens wurde das Gefäß zur Aorta abdominalis hin kurzzeitig abgeklemmt. Mit einer Irisschere wurde der aufgespannte Gefäßabschnitt möglichst distal inzidiert, mit einer feinen, spitzen Gefäßpinzette die Inzisionsstelle vorsichtig aufgespreizt, das PP 10 Ende des mit NaCl-Heparinlösung gefüllten Katheters ca. 5 mm zwischen den Branchen der Gefäßpinzette in die Arterie hineingeschoben und mit einer stumpfen Pinzette festgehalten. Danach wurde der proximale Faden gelockert und der Katheter ca. 35 mm tief in die A. femoralis vorgeschoben. Danach wurde der noch bestehende proximale, lose Knoten ebenfalls zugezogen, um ein Herausgleiten des Katheters zu verhindern. Der Katheter wurde mit NaCl-Heparinlösung gespült, an seinem distalen Ende zunächst abgeklemmt und dann mit einem Handfeuerzeug erwärmt und durch Fingerdruck verschlossen.

Die Ratte wurde nun auf den Bauch umgelagert. Ein zweiter ca. 5 mm langer Hautschnitt erfolgte im Bereich des Nackens des Tieres. Mittels eines Trokars mit ca. 5 mm Außendurchmesser wurde eine subkutane Verbindung zwischen beiden Hautschnitten geschaffen. Der Katheter wurde nun durch diese Verbindung zwischen Nacken und Leiste unter der Haut durchgezogen und am Nacken herausgeführt. Das am Nacken heraustretende Katheterende wurde direkt an der Austrittsstelle mit einem 5 mm breiten Klebestreifen umklebt und mit zwei Bindfäden an der geschützten Stelle umschlungen. Über die beiden Fäden wurde der Katheter anschließend an der Nackenhaut fixiert und gleichzeitig der Hautschnitt verschlossen. Dabei musste darauf geachtet werden, dass der Katheter bei späteren Bewegungen des Tieres nicht unter Zug stand. Anschließend erfolgte der Verschluss des Hautschnittes in der Leistenbeuge mit einer Einzelknopfnah. Zuletzt wurde der Katheter nochmals

mit NaCl-Heparinlösung gespült, das Katheterende auf 50 mm gekürzt und dann erneut mit einem Handfeuerzeug zugeschweißt. Die Operationsdauer betrug durchschnittlich 20 min. Die postoperative Erholungsphase bis zum Beginn der Experimente dauerte zwei Tage.

2.3.2. Modell der fokalen Hirnischämie mit Reperfusion

2.3.2.1. Herstellung des okkludierenden Fadens

Der Hauptarbeitsschritt bestand aus der Herstellung des okkludierenden Fadens nach dem Model von Longa et al. (1989). Ein monofiler Nylonfaden von der Firma Ethicon (Ethilon, Ethicon GmbH & Co KG, Deutschland) wurde gekürzt und mit einer dünnen Schicht Silikon (Provil, Bayer AG, Deutschland) beschichtet. Das Silikon sollte vor dem Gebrauch 3-4 Tage aushärten. Der Faden wurde auf einer Länge von 17 mm markiert. Die Markierung stellte die Standardlänge des Fadens dar, welche in die Arteria carotis interna eingeführt wurde.

2.3.2.2. Anästhesie und Operation

Die Narkose der Ratten wurde mit einer intraperitonealen (i.p.) Injektion von 4 % Chlorhydrat mit einer Dosis von 400 mg/kg (1 ml/100 g Körpergewicht) durchgeführt. Die rechte Arteria Carotis (AC) communis wurde mit einem lateralen Halsschnitt freigelegt und vom Nervus Vagus separiert. Darauf wurden beide Äste der Carotis, die AC externa und die AC interna unter dem Operationsmikroskop vom umgebenden Gewebe isoliert. Vor der Einführung des silikonbeschichteten 4/0 Nylon monofilen Fadens wurde die rechte AC externa und AC interna mit einer 4/0 Ligatur verschlossen. Der Faden wurde unter Überwachung mittels Laser-Doppler Flussmessung (LDF) (siehe 2.5.1) in die ACC eingeführt und vorsichtig in Richtung AC interna, etwa bis 17 mm vor die Bifurkation, vorgeschoben. Der Faden wurde mit einer festen Ligatur in der AC communis befestigt. Die Reperfusion wurde 90 min. nach MCAO durch Entfernung des verschließenden Fadens durchgeführt. Die rektale Temperatur wurde während der gesamten Operationsperiode aufgezeichnet und mit Hilfe eines Heizkissens zwischen 37° und 37,5 °C gehalten.

2.3.2.3. Überwachung des regionalen zerebralen Blutflusses mit der Laser-Doppler Flussmessung

Die häufigsten Komplikationen des intraluminalen Fadenmodells sind die insuffiziente MCAO sowie die ungewollte subarachnoidale Hämorrhagie (SAH). Die kontinuierliche bilaterale LDF ist für die Überwachung der adäquaten MCAO unentbehrlich sowie hochsensibel zur Erkennung einer SAH (Schmid-Elsaesser et al., 1998). Der regionale zerebrale Blutfluss (rCBF) wurde im Versorgungsgebiet der Arteria Cerebri media beider Hemisphären des zerebralen Kortex mit der Laser-Doppler Flussmessung (LDF) (Petriflux system 500) gemessen. Der Kopf der Ratte wurde mit dem David-Kopf-Instrument fixiert. In der Mittellinie der Kopfhaut wurde eine Inzision durchgeführt. Daraufhin wurden 5 mm lateral und 1 mm posterior zum Bregma (der Punkt am Schädel, in dem Pfeilnaht auf

die Kranznaht stößt) 1 mm große Löcher gebohrt. Die Dura wurde intakt gelassen um einen Verlust von Liquor, der cerebrospinalen Flüssigkeit, zu verhindern. Es wurden darauf Kanülen mit einem Innerendurchmesser von 1 mm und Außerendurchmesser von 2 mm in die gebohrten Löcher eingebracht und mit Zahnzement fixiert. Die Laser-Doppler Sonden wurden durch die Kanülen vorsichtig bis zur intakten Dura Mater vorgeschoben. Der rCBF wurde kontinuierlich, von 30 min vor der Ischämie, Anfang der MCAO (0), während der 90 min Ischämie und während der 30 min Reperfusion, gemessen. Diese Werte wurden alle 10 min aufgezeichnet und aus ihnen prozentuale Ausgangsdaten errechnet.

Der Faden wurde so weit vorgeschoben, bis der ipsilaterale Fluss auf ungefähr 20 % der Ausgangsdaten abgesunken war. Sobald die ipsilaterale LDF einen Hinweis auf frühzeitige Reperfusion gab, wurde die Position des Fadens sofort korrigiert. Der kontralaterale rCBF blieb unverändert und fluktuierte um die 100 % der Ausgangsdaten. Nach dem Entfernen des Fadens wurde die Perfusion auf 60-70 % der Werte der Ausgangsdaten wiederhergestellt.

Wurde kein Rückgang der Ausgangsdaten auf 25 % erreicht, war die Okklusion der MCA der Ratte inadäquat. Stieg der contralaterale rCBF nach Einführen des Fadens an und wurde ipsilateral eine verminderte Reperfusion mit der LDF nach Entfernen des Fadens gemessen, so erlitt die Ratte eine SAH. Alle diese Ratten wurden von der Studie ausgeschlossen.

2.3.2.4. Blutparameter

Bei 8 Tieren pro Gruppe wurde zu verschiedenen Zeitpunkten eine i.a. Blutentnahme aus der A. femoralis durchgeführt. Es wurde der pH, pCO₂, pO₂ sowie die Konzentrationen von Laktat, Glukose, Natrium, Kalium und Chlorid mit Hilfe eines RADIOMETERS ABL 700 SERIE gemessen. Hierzu wurde eine heparinisierte Glaskapillare benutzt. Es wurde jeweils 100 µl Blut entnommen und durch NaCl ersetzt um einen Volumenmangel zu verhindern. Folgende Zeitpunkte wurden gewählt: Ratte bei Bewusstsein, 10 min nach Anästhesie direkt vor MCAO, 30 und 90 min nach Beginn in MCAO sowie 30 min nach Beginn der Reperfusion.

2.4. Messung von Blutdruck und Herzfrequenz

Die Messung von systolischem Blutdruck (SBP), diastolischem Blutdruck (DBP), dem mittleren arteriellen Druck (MAP) und der Herzfrequenz (HF) wurde 1 h vor der Anästhesie begonnen und kontinuierlich während der Operation, der MCAO Periode bis 4 h nach der Applikation von Vehikel und Candesartan durchgeführt.

2.5. Evaluation des neurologischen Defizits

Der neurologische Status jeder Ratte wurde nach 24 h und nachfolgend täglich bis zur Entnahme des Gewebes beurteilt. Um eine subjektive Bewertung auszuschließen, durfte bei der Untersuchung des neurologischen Status die Behandlung des Tieres nicht bekannt sein. Zwei neurologische Messsysteme wurden zur Beurteilung der Auswirkungen des Infarktes verwendet.

2.5.1. Die Messskala nach Bederson et al. (1986)

Bei dieser Methode wird der Grad der folgenden drei Parameter, die Flexion der Vordergliedmaßen im Vergleich von der kontralateralen zur ipsilateralen, verletzten Seite, die Resistenz gegenüber seitlichem Stoß und die Beobachtung von kreisenden Bewegungen bzw. Verhalten, evaluiert (Tabelle 1). Die Tests wurden aufeinanderfolgend durchgeführt. Wenn die Ratte ein Verhalten zeigte, welches für diesen Schritt angemessen war, jedoch nicht für den folgenden, so wurde es nach dem ersten bewertet. Ratten mit keinem erkennbaren Defizit wurden als Grad 0 eingestuft. Ratten, die ein kreisendes Verhalten zusammen mit der Flexion der Vordergliedmaßen sowie einen Verlust von Standfestigkeit gegenüber seitlichem Stoß zeigten, wurden als Grad 3 eingestuft.

Normal	Grad 0	Kein erkennbares Defizit
Mittelmäßig	Grad 1	Flexion der Vordergliedmaße
Schwer	Grad 2	Flexion der Vordergliedmaße, verminderte Resistenz gegenüber einem seitlichen Stoß ohne kreisende Bewegungen
Sehr schwer	Grad 3	Gleiches Verhalten wie bei Grad 2 mit zusätzlichen kreisenden Bewegungen

Tabelle 1. Das Bewertungsmodell des neurologischen Defizits nach Bederson

2.5.2. Messskala nach Garcia et al. (1995)

Um das neurologische Verhalten zu untersuchen, wurden die folgenden sechs Tests nach Garcia et al. (1995) durchgeführt:

Die Spontanaktivität

Das Tier wurde 5 min in seinem normalen Umfeld (Käfig) beobachtet. Die Aktivität der Ratte wurde nach der Fähigkeit, alle vier Wände des Käfigs zu erreichen, beurteilt. Die Werte lassen folgendes erkennen: 3, die Ratte lief herum, erkundschafte das Umfeld und erreichte mindestens drei Wände des Käfigs; 2, die leicht beeinträchtigte Ratte lief im Käfig herum erreichte aber nicht alle Seiten des Käfigs und war zögerlich in ihren Bewegungen, obwohl sie bei Gelegenheit doch noch wenigstens einen oberen Rand des Käfigs erreichte; 1, eine schwer beeinträchtigte Ratte, die sich nicht aufrichtete und kaum bewegte; und 0, die Ratte bewegte sich überhaupt nicht.

Symmetrie in der Bewegung der vier Extremitäten

Die Ratte wurde, um die Symmetrie der Bewegung der vier Extremitäten zu beurteilen, am Schwanz in die Luft gehalten. Die Werte lassen folgendes erkennen: 3, alle vier Extremitäten wurden symmetrisch gestreckt; 2, die Extremitäten der linken Seite wurden weniger oder langsamer gestreckt als die der rechten; 1, die Extremitäten der linken Seite zeigten minimale Bewegung, und 0, die Extremitäten der linken Seite bewegten sich überhaupt nicht.

Das Ausstrecken der Vorderpfoten

Die Ratte wurde auf der Tischkante abgesetzt, um auf den vorderen Extremitäten zu laufen, während sie an Schwanz festgehalten wurde. Die Werte lassen folgendes erkennen: 3, beide Vorderläufe waren gestreckt und die Ratte lief symmetrisch auf beiden Vorderpfoten; 2, die linke Seite war weniger gestreckt als die rechte und das Laufen auf den Vorderpfoten war beeinträchtigt; 1, der linke Vorderlauf bewegte sich nur minimal; 0, der linke Vorderlauf bewegt sich nicht.

Das Klettern

Die Ratte wurde an der Wand eines Drahtkäfigs abgesetzt. Normalerweise benutzt die Ratte alle vier Extremitäten, um die Wand hinauf zu klettern. Beim Entfernen der Ratte vom Drahtkäfig wurde die Kraft gemessen, mit der sich die Ratte am Käfig festhielt: 3, die Ratte kletterte leicht herauf und hielt sich stark am Gitter fest; 2, die linke Seite war beim Klettern beeinträchtigt und hielt sich nicht so fest wie die rechte; 1, die Ratte schaffte es nicht zu klettern.

Die Körperpropriozeption

Die Ratte wurde auf beiden Seiten des Körpers mit einem stumpfen Gegenstand berührt und die Reaktion wurde beobachtet. Die Werte lassen folgendes erkennen: 3, die Ratte reagierte mit einer Drehung des Kopfes und war nach Stimulus beider Seiten gleich stark aktiviert; 2, die Ratte reagierte auf den Stimulus der linken Seite langsamer; und 1, die Ratte reagierte nicht auf den Stimulus auf der linken Seite.

Reaktion auf Berührung der Sinushaare

Es wurde bei der Ratte auf beiden Seiten mit einem stumpfen Gegenstand über die Schnurrhaare gestrichen. Dies wurde vom hinteren Ende der Ratte in Richtung Schnurrhaare durchgeführt, um das Eintreten ins Gesichtsfeld zu vermeiden. Die Werte lassen folgendes erkennen: 3, die Ratte reagierte mit einer Drehung des Kopfes und war nach Stimulus beider Seiten gleich stark erschrocken; 2, die Ratte reagierte auf den Stimulus der linken Seite langsamer; und 1, die Ratte reagierte nicht auf den Stimulus der linken Seite.

Der Wert, der jeder Ratte gegeben wurde nach Beendigung der Evaluation, ist die Summe aller sechs Testergebnisse. Der kleinste neurologische Wert ist 3 und der Größte ist 18.

2.6. Behandlungsprotokoll

Der Aufbau dieser Untersuchung stellt sich wie folgt dar: Zu Beginn der Behandlung wurde die Okklusion der A. Cerebri media (MCAO) für 90 Minuten mit Reperfusion durchgeführt. Es wurden jeweils Gruppen mit $n = 18$ Tieren untersucht und verglichen. Drei Stunden nach MCAO wurde die Behandlung mit Vehikel bzw. Candesartan (3mg/kg/KG) begonnen. Zudem wurden die Untersuchungen zu einem späteren Zeitpunkt begonnen, 24 h nach MCAO. Auch hier wurde eine Gruppe der Tiere mit Candesartan (3 mg/kg/KG) sowie eine weitere mit Vehikel behandelt.

Die neurologischen Untersuchungen wurden 24 h nach MCAO begonnen und im Anschluss täglich an zwei bzw. sieben aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt (Abb. 4).

Die Messung des Infarktvolumens sowie die Durchführung der Immunhistochemie wurde zwei bzw. sieben Tage nach MCAO durchgeführt (Abb. 4).

Behandlungsprotokoll

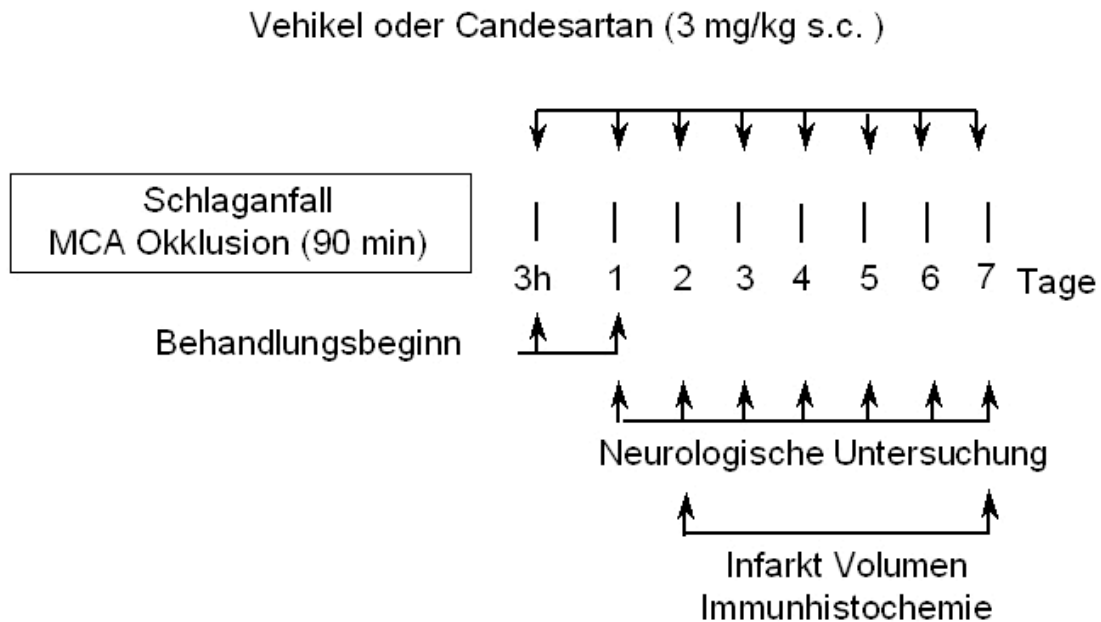


Abb. 4 Behandlungsprotokoll

2.7. Gehirnentnahme

Die Ratten wurden zwei bzw. sieben Tage nach MCAO mit Chloralhydrat (400 mg/kg) in eine tiefe Narkose versetzt. Es erfolgte die intrakranielle Perfusion mit PBS. An diese schloss sich zur Fixierung des Hirngewebes eine Perfusion mit einer 4 %-igen Paraformaldehyd-Lösung über Nacht an. Am nächsten Tag wurde das Gehirn zur Kälteprotektion in eine 30 % Saccharoselösung für 3-4 Tage bei 4 °C inkubiert. Nach dem Rattengehirnatlas von Paxinos & Watson (1986) wurden beginnend vom Bregma +3,7 mm bis -6,7 mm 40 µm dicke Schnitte mit Hilfe des Kryostaten bei -20 °C angefertigt. Jeder zwanzigste Schnitt wurde zur Messung des Infarktvolumens auf einen gelatinebeschichteten Objektträger gebracht. In diesem Arbeitsschritt wurden auch Serienschnitte aus verschiedenen Arealen (Bregma -0,3 mm; -1,9 mm und -3,5 mm) für die Immunhistochemie angefertigt und in mit 0,2 % Paraformaldehyd-Lösung befüllte Mikrowellschalen gegeben.

2.8. Bestimmung des Infarktvolumens (Cresylviolett-Färbung)

Zur Bestimmung des Infarktvolumens wurden die Schnitte (40µm) nach dem folgenden Protokoll mit Cresylviolett gefärbt:

1. Waschen in destilliertem Wasser für 1 min.
2. Inkubieren in vergälltem 100 % Ethanol für 3 min.
3. Inkubieren in 100 % Xylol für 15 min.
4. Inkubieren in vergälltem 100 % Ethanol für 3 min.
5. Waschen in destilliertem Wasser für 1 min.
6. Färben in Cresylviolett-Lösung für 5 min.
7. Waschen in destilliertem Wasser für 1 min.
8. Waschen in Säure/Ethanol für ein paar sec, mehrfach eintauchen, bis die Färbung optimal ist.
9. Waschen in destilliertem Wasser zweimal für 1 min, Wasser wechseln.

Nach dem Trocknen eindecken mit Deckgläsern mit Hilfe vom Pertex.

Die gefärbten Schnitte wurden an 11-14 zuvor definierten Stellen analysiert (Bregma +3,7; +2,9; +2,1; +1,3; +0,5; -0,3; -1,1; -1,9; -2,7; -3,5; -4,3; -5,1; -5,9 und -6,7). Die Schnitte wurden eingescannt und mittels eines Computerprogramms, dem Image J, ausgewertet. An jedem Schnitt wurde der Bereich des Infarktes gemessen, indem das Gebiet mit Hilfe des Computerprogramms umrandet wurde und die jeweilige Fläche errechnet wurde. Das Infarktvolumen wurde durch Multiplizieren der Summe der Infarktflächen unter der Berücksichtigung des Abstandes zwischen den einzelnen Flächen errechnet (Zhang et al. 2001).

Zusätzlich wurde die kontralaterale und ipsilaterale Hemisphäre gemessen. Die Differenz zwischen der ipsilateralen und der kontralateralen Hemisphäre wurde zur Berechnung des Ödemvolumens benutzt (Justicia et al. 1999). Es besteht die Möglichkeit, dass das Infarktvolumen vom Ödemvolumen beeinflusst wird, deshalb wurde die Formel von Swanson et al. (1990) zur Berechnung des prozentualen Infarktvolumens benutzt:

$$\% \text{ Infarkt: } 100 \times (V_C - V_L) / V_C$$

% Infarkt = der Prozentsatz der Hemisphere, die einen ischämischen Infarkt erlitten hat

V_C = normales Volumen der kontralateralen Seite

V_L = nicht infaziertes Bereich der ipsilateralen Seite

d = Distanz zwischen den Bereichen

A_C = Areal des normalen Gewebes der kontralateralen Hemisphere aus dem Bereich i

A_L = Areal des normalen Gewebes der ipsilateralen Hemisphere aus dem Bereich i

$$V_C \sim d \times \sum_i^n A_C$$

$$V_L \sim d \times \sum_i^n A_L$$

2.9. Immunhistochemie

2.9.1. "TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling" TUNEL Färbung

Die TUNEL Färbung wurde unter der Benutzung eines Kits zur Detektion der Apoptose nach den Angaben des Herstellers (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Nur stark markierte TUNEL-positive Zellen wurden als apoptotisch angesehen, während leicht gefärbte nicht evaluiert wurden.

Es wurden drei Areale nach dem Atlas von Paxinos & Watson für die Immunhistochemie definiert. Aus diesen Gebieten wurden Schnitte mit dem Kryostaten von 40 µm Dicke geschnitten, in 24-Mirrowellschalen mit 0,2 % Paraformaldehyd Lösung gesammelt und nach dem folgenden Protokoll gefärbt:

1. Blockierung der endogenen Peroxidase mit 0,3% H_2O_2 in Methanol bei Raumtemperatur (RT): 400 µl/ well Waschen mit PBS, zweimal für jeweils 3 min.
2. Permeabilisation mit 0,1 % Triton x-100 in tri-Natriumcitrat-Dihydrat-Puffer für 5 min bei RT: 400µl /well Waschen mit PBS, zweimal für jeweils 3 min.
3. Inkubieren mit TUNEL-Reaktionslösung für 1 h bei 37°C.
4. Waschen mit PBS, dreimal für jeweils 3 min.
5. Detektion der markierten dUTPs mit dem speziellen Antikörper, TUNEL POD: Inkubation für 30 min bei 37°C.
6. Waschen mit PBS, dreimal für jeweils 3 min.
7. Inkubation mit DAB-Reagenz für ca. 30 sec bis die Färbung optimal ausfiel, Nachweis mittels Lichtmikroskop.
8. Waschen mit PBS, dreimal für jeweils 3 min.
9. Schnitte mit Hilfe eines Deckglas, Pinsel und Wasser auf unbeschichtete Objektträger bringen und bei RT trocken lassen.
10. Nach dem Trocknen eindecken mit einem Deckglas mit Hilfe von Pertex.

Als Negativkontrolle wurde die Färbung mit destilliertem Wasser anstelle der terminalen Transferase zum Ansetzen der Reaktionslösung durchgeführt.

Aus jeder Gruppe wurden 6 Tiere für die TUNEL Färbung verwendet. TUNEL-markierte Zellen wurden unter der Benutzung des Computer Programm Leica Qwin in drei Bereichen (375 x 500µm) der Penumbra, die Grenze zwischen Infarkt zu gesundem Gewebe, gezählt.

2.9.2. Färbung aktivierter Mikroglia und Makrophagen

Für die Analyse der aktivierten Mikroglia und Makrophagen wurde ein frei-schwimmender Schnitt mit einem für aktivierte Mikroglia und Makrophagen spezifischen Antikörper (mouse anti-rat ED-1, Serotec, Düsseldorf, Deutschland) für zwei Nächte bei 4 °C inkubiert. Das Signal wurde daraufhin mit einem zweiten Antikörper (goat anti-mouse, Vector Laboratories, Burlingame CA, USA) verstärkt und

mit eine Peroxidase gekoppelt, unter Benutzung der Avedin-Biotin-Komplexes (ABC) Methode (Vectastain, Vector Laboratories, Burlingame CA, USA). Dieses Immunolabeling wurde mit 3,3'-Diaminobenzidine als Farbstoff visualisiert.

Es wurden auch hier in den für die Immunhistochemie definierten Areale Schnitte von 40 µm Dicke geschnitten, in 24-Microwellschalen mit 0,2 % Paraformaldehyd Lösung gesammelt und nach dem folgenden Protokoll gefärbt:

1. Waschen mit PBST, dreimal für jeweils 5 min.
2. Inkubation mit frisch angesetztem 3 % H₂O₂ in Methanol für 5 min bei RT.
3. Waschen mit PBST, zweimal für 5 min.
4. Waschen mit 5% NGS in PBST, für 15 min.
5. Inkubieren mit 300 µl/well Primärantikörper, mouse monoclonal ED1, in PBS für zwei Nächte bei 4°C. Endkonzentration 1:1000
6. Waschen mit PBS, dreimal für jeweils 5 min.
7. Inkubation des zweiten Antikörper, goat anti mouse, in PBST 1:300 für 60 min bei 37°C
8. Waschen in PBS, dreimal für jeweils 5 min.
9. Inkubieren mit ABC Lösung, für 45 min bei 37°C
10. Waschen mit PBS, dreimal für jeweils 5 min.
11. Inkubation mit DAB Reagenz für ca. 1 min bis die Färbung optimal ausfällt
12. Schnitte mit Hilfe eines Deckglases, Pinsel und Wasser auf unbeschichtete Objektträger bringen und bei RT trocknen.

Die gefärbten Schnitte wurden nach dem Trocknen mit Hilfe von Pertex und Deckglas eingedeckt.

Aus jeder Gruppe wurden 6 Tiere für die Färbung der aktivierten Mikroglia verwendet. Aktivierte Mikroglia wurden unter der Benutzung des Computer Programm Leica Qwin in drei Bereichen (375 x 500 µm) der Penumbra, die Grenze zwischen Infarkt und gesundem Gewebe, gezählt.

2.10. Statistische Auswertung

Alle Werte sind als Mittelwerte \pm SEM (Standardwert) dargestellt. Die zeitabhängigen Effekte von Candesartan auf das neurologische Defizit, MAP und HR wurden durch Varianzanalysen für wiederholte Messungen mit Hilfe der SYSTAT Software ausgewertet. Bei Signifikanz erfolgte ein Vergleich zwischen der Vehikel- und der Candesartangruppe zu jedem Zeitpunkt durch einen t-Test für unabhängige Stichproben. Die Effekte von Candesartan auf das Infarktvolumen, Ödemvolumen, TUNEL und ED-1 wurden zu den jeweiligen Zeitpunkten durch t-Tests für unabhängige Stichproben ausgewertet. Als statistisch signifikant wurde $p < 0.05$ angenommen.

3. Ergebnisse

3.1. Der regionale zerebrale Blutfluss

Es ist wichtig zu zeigen, dass bei allen Ratten das Ausmaß der Reduktion des CBF im Infarktkern und die Zunahme des CBF nach Reperfusion identisch war. Die Reduktion des rCBF auf unter 25% der Ausgangswerte galt als Indikator für eine erfolgreiche Okklusion der Arteria cerebri media. Aus diesem Grund wurden nur Ratten mit einer Reduktion des rCBF und mehr als 75% in die Studie aufgenommen. Die rCBF Reduktion war während MCAO bei allen Gruppen identisch. Der kontralaterale rCBF zeigte sich normwertig während der Periode der Ischämie. Nach der Entfernung des Fadens regenerierte sich der Blutfluss auf der ipsilateralen Seite auf 70-80 % der Ausgangswerte in allen Gruppen (Abb.5).

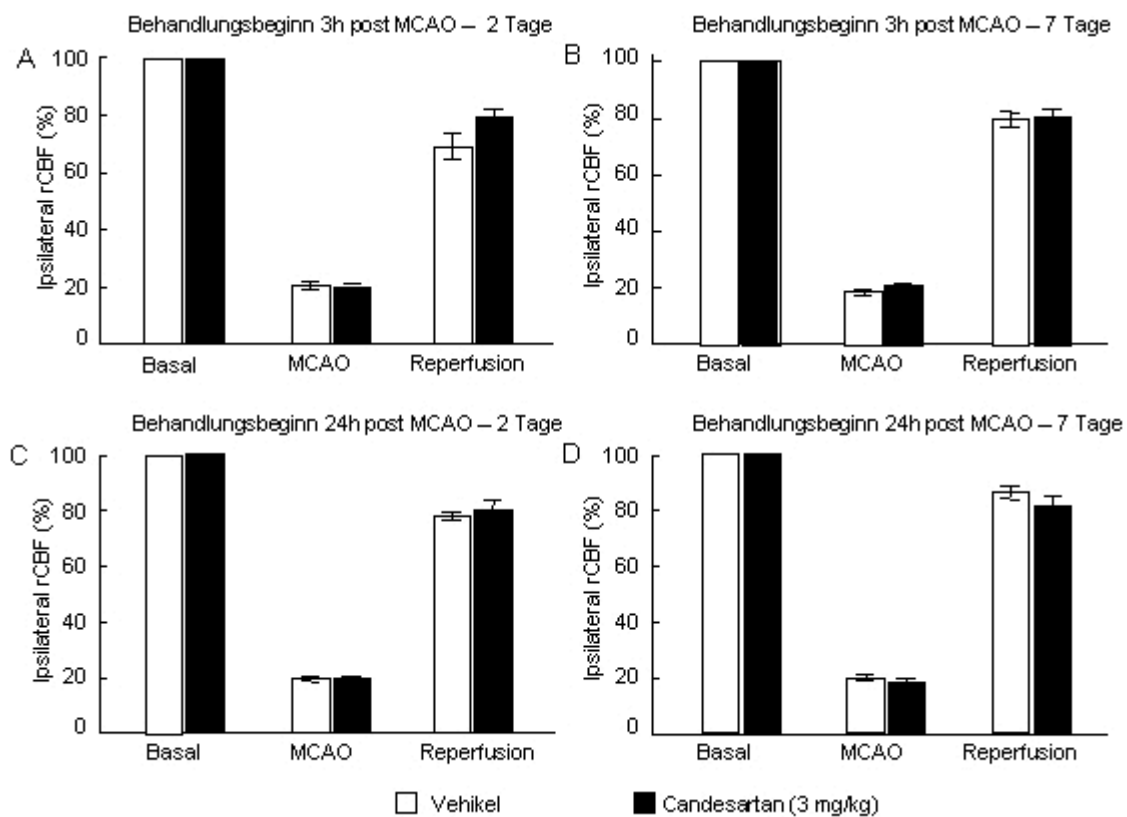


Abb. 5 Veränderungen im ipsilateralen regionalen zerebralen Blutfluss (rCBF) im Bereich der Ischämie während der Okklusion der A. cerebri media (MCAO) für 90 min und während der Phase der Reperfusion bei normotensiven Ratten nach der s.c. Behandlung mit Vehikel (■) oder Candesartan 3 mg/kg (□). Die Behandlung wurde 3 h nach MCAO-Induktion (A u. B) oder 24 h nach MCAO-Induktion (C u. D) begonnen. Die Länge der Behandlung betrug 2 Tage (A u. C) oder 7 Tage (B u. D). Die rCBF-Werte (Mittelwerte \pm SEM) wurden als Prozent im Vergleich zum Ausgangswertes vor Okklusion dargestellt. Es wurden keine signifikanten Unterschiede in rCBF zwischen den Vehikel-behandelten Tieren und den Candesartan-behandelten Tieren beobachtet.

3.2. Mittlerer arterieller Blutdruck, Herzfrequenz und Blutparameter

SBP, DBP und MAP sanken bei allen Ratten nach Beginn der Anästhesie ab. Das Absinken des Blutdrucks wurde begleitet vom Anstieg der Herzfrequenz. Die Herzfrequenz blieb während der MCAO stabil und es wurden keine Unterschiede bei den beiden Gruppen während der Phase der Reperfusion registriert. 90 min nach der Reperfusion (3 h nach dem Beginn der MCAO) wurden die Ratten subcutan mit Vehikel oder Candesartan (3 mg/kg) behandelt. Die systemische Gabe von 3 mg/kg Candesartan senkte zügig und deutlich SBP, DBP und MAP. Eine signifikante Reduktion von SBP, DBP und MAP konnte bereits 15 min nach s.c. Injektion beobachtet werden (Abb. 6).

Es wurden während und nach der MCAO keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen bei den Blutparametern pH, pCO₂, pO₂ und Konzentrationen von Laktat, Glukose, Natrium, Kalium und Chlorid beobachtet.

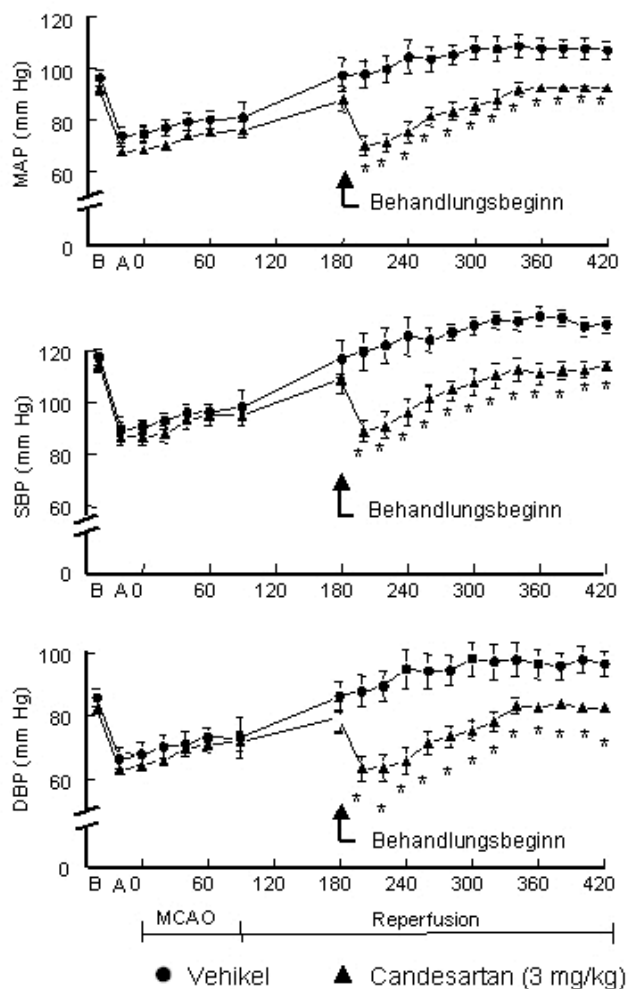


Abb. 6 Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP), systolischer Blutdruck (SBP) sowie diastolischer Blutdruck (DBP) zum Ausgangszeitpunkt (B), nach Anästhesie (A), während der Okklusion der A. cerebri media für 90 min (MCAO) und in der Phase der Reperfusion bei Ratten nach der s.c. Behandlung mit Vehikel (●) oder Candesartan 3 mg/kg (▲). Die Behandlung wurde 3 h nach MCAO begonnen. Alle Werte sind als Mittewerte \pm SEM (Standardwert) dargestellt. * $P < 0,05$

3.3. Neurologisches Defizit nach Schlaganfall

Das System zur Evaluation des neurologischen Defizits von Bederson et al. (1986) testet einfache Reflexe und motorische Beeinträchtigungen. Die Kontrolltiere zeigten 24 h und 48 h nach MCAO deutliche neurologische Defizite. Der neurologische Status verbesserte sich allmählich in der darauffolgenden siebentägigen Beobachtungsperiode. Die systemische Behandlung mit Candesartan, 3 h nach MCAO, verbesserte signifikant Reflexe und motorische Funktionen. Der Unterschied zwischen den Kontrolltieren und den Candesartan-behandelten Tieren wurde bereits 24 h nach Beginn der Behandlung sichtbar. Obwohl sich mit der Zeit bei allen Behandlungsgruppen der neurologische Status verbesserte, war eine signifikante Verbesserung der neurologischen Beeinträchtigungen bei den Candesartan-behandelten Tieren während der ganzen siebentägigen Beobachtungsperiode deutlich feststellbar (Abb. 7a).

Bei spätem Beginn der Behandlung mit Candesartan (24 h nach MCAO) konnten keine Verbesserungen des neurologischen Defizits beobachtet werden. Ähnliche Resultate waren bei dem System zur Auswertung des neurologischen Status nach Garcia et al. (1995) zu beobachten. Ein signifikanter Unterschied zwischen Kontrolltieren und den Candesartan-behandelten Tieren wurde schon 24 h nach MCAO deutlich und blieb über die folgende sieben Tage der Beobachtung bestehen (Abb. 7b).

Die Messskala für den neurologischen Status nach Gracia et al. (1995) untersucht, abgesehen von motorischer Beeinträchtigung der Spontanaktivität, auch die sensorische Funktion der Tiere. Dafür werden die einzelnen Komponenten (Spontanaktivität, Symmetrie der Bewegung der vier Extremitäten, Ausstrecken der Vorderpfoten, Klettern, Propriozeption, Reaktion auf Berührung der Sinushaare) beobachtet und ihr zeitabhängiger Verlauf nach einem Schlaganfall ausgewertet (Abb. 8).

Bei der Behandlung mit 3 mg/kg Candesartan konnten in der Beobachtungsperiode der ersten 3 bis 4 Tage nach MACO keine Verbesserung des Ausstreckens der Vorderpfote beobachtet werden und nur leichte Effekte auf Symmetrie der Bewegung der vier Extremitäten und das Klettern. Nach dieser Periode verbesserten sich das Ausstrecken der Vorderpfoten und die Symmetrie in der Bewegung der vier Extremitäten jedoch zu einem größeren Ausmaß als bei Vehikel-behandelten Tieren (Abb. 8c).

Eine Verbesserung der sensorischen Funktionen wurde in den ersten 3 bis 4 Tage nach MCAO erzielt (Abb. 8a).

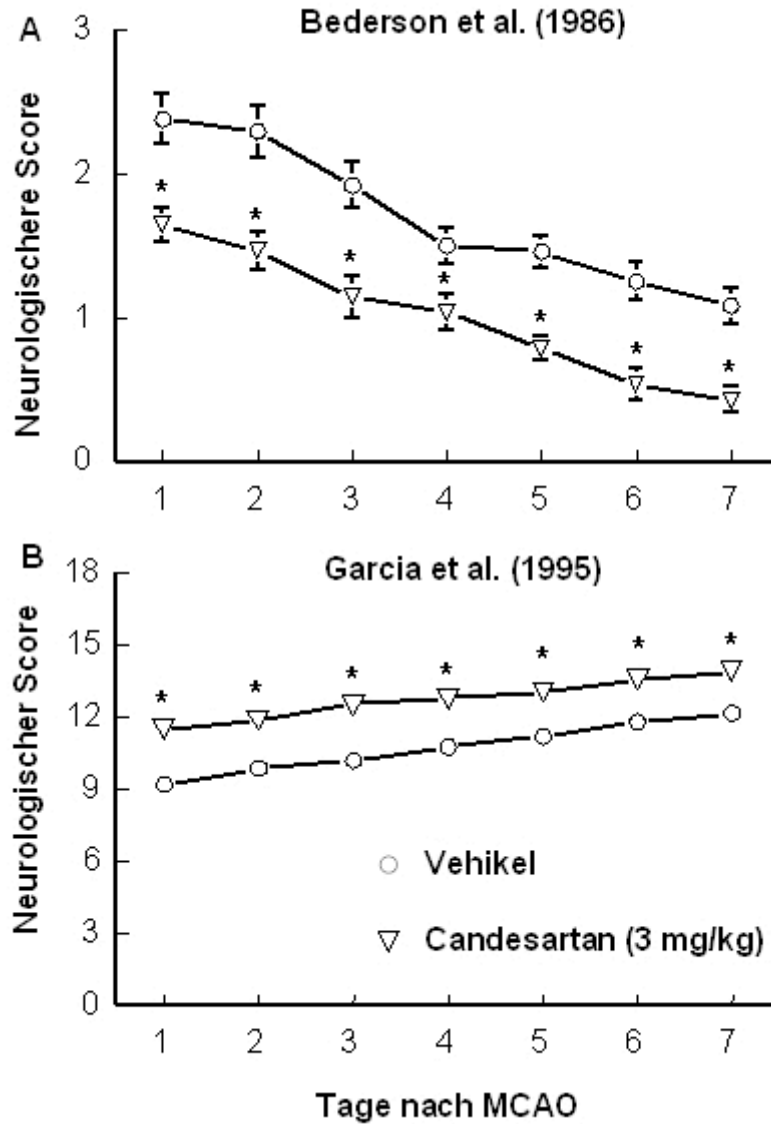


Abb. 7 Neurologisches Defizit bei normotensiven Ratten nach der s.c. Behandlung mit Vehikel (○) oder Candesartan 3 mg/kg (▽) auf das Ausmaß nach Okklusion der A. cerebri media (MCAO) für 90 min. Die Behandlung wurde 3 h nach MCAO-Induktion begonnen. (A) Das Bewertungsmodell des neurologischen Defizits mit einer Scala von 1-3 nach Bederson *et al.* wurde benutzt. Zu berücksichtigen ist, dass Ratten mit einem besseren neurologischen Status einen niedrigeren neurologischen Messwert haben. (B) Bewertungsmodell des neurologischen Defizits mit einer Scala von 3-18 nach Garcia *et al.* wurde benutzt. Ratten mit einem besseren neurologischen Status erhielten einen höheren Messwert. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm SEM (Standardwert) dargestellt (* $P < 0,05$).

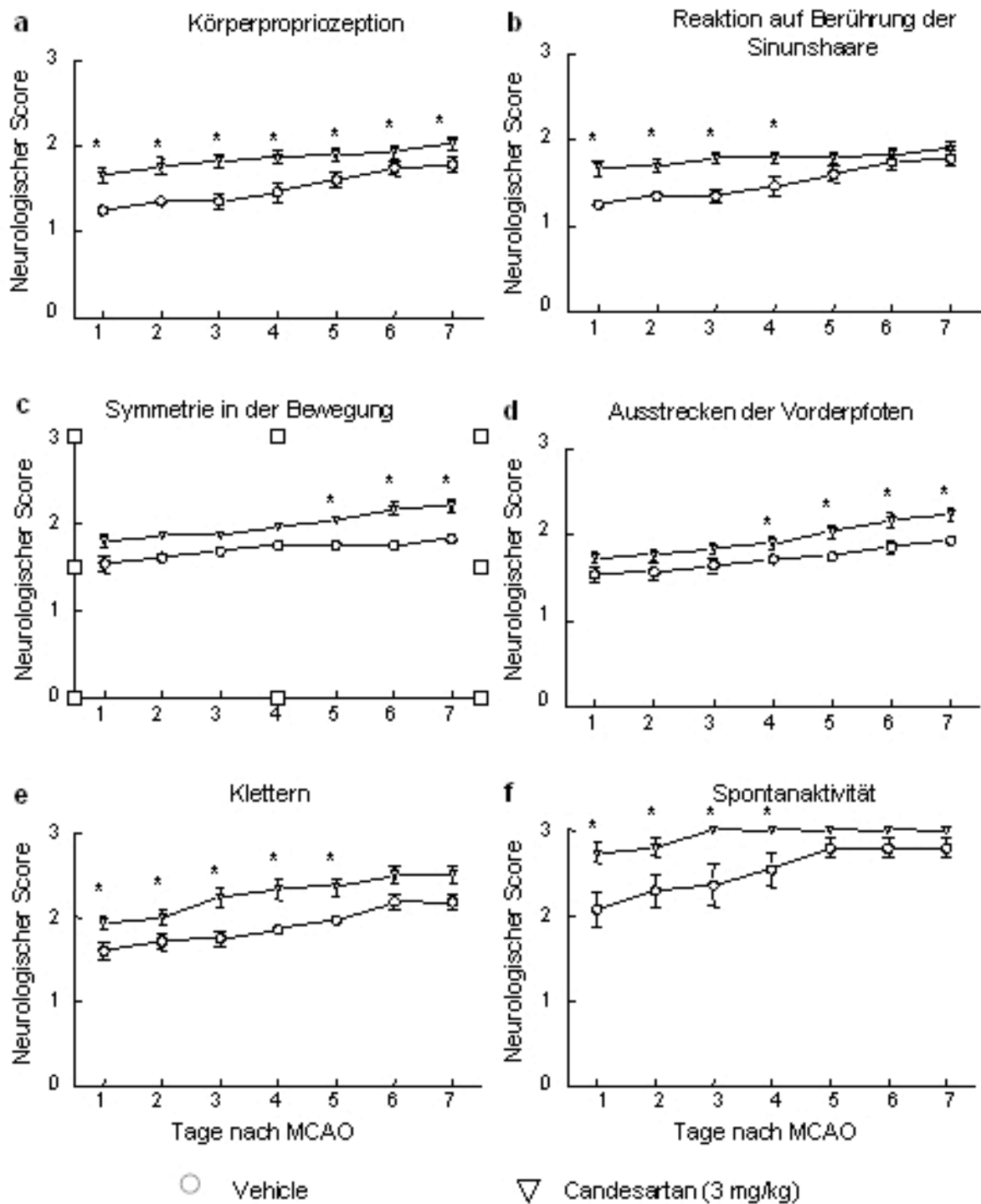


Abb. 8 Neurologisches Defizit bei normotensiven Ratten nach der s.c. Behandlung mit Vehikel (○) oder Candesartan 3 mg/kg (▽) nach Okklusion der A. cerebri media (MCAO) von 90 min. (a-b) Neurologischer Score des sensorische Defizits. (c-f) Neurologischer Score des motorische Defizits. Das Bewertungsmodell des neurologischen Defizit mit einer Scala von 3-18 nach Garcia et al. (1995) wurde benutzt. Ratten die kein erkennbares Defizit zeigten, wurden mit Grad 3 bewertet und schwer beeinträchtigte Ratten mit Grad 0 oder 1. Ratten mit einem besseren neurologischen Status erhielten einen höheren Messwert. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm SEM (Standardwert) dargestellt.

Nach spätem Beginn der Behandlung mit Candesartan (24 h nach MCAO) konnte kein signifikanter Effekt auf die neurologischen Defizite beobachtet werden (Abb. 9).

Die beiden Modelle zur Beurteilung des neurologischen Status (Bederson et al. 1986 u. Garcia et al. 1995) konnten nahezu das identische Ausmaß an neurologischen Defiziten in allen einzelnen Gruppen über die gesamte siebentägige Beobachtungsperiode aufzeigen (Abb. 9).

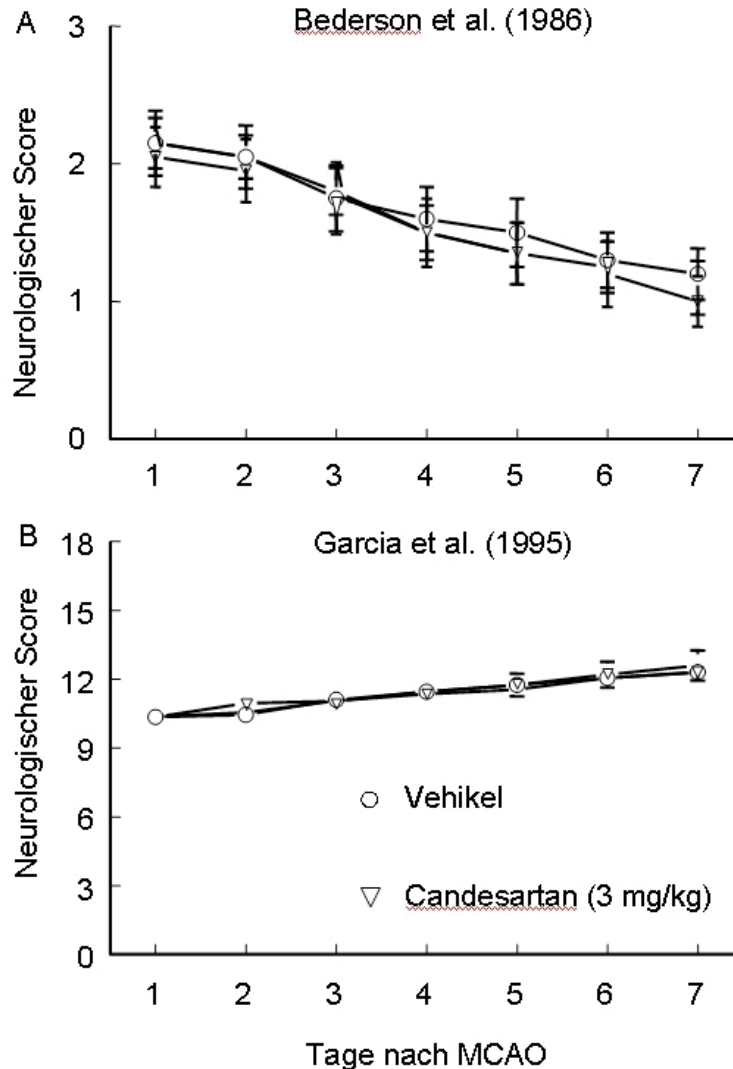


Abb. 9 Neurologisches Defizit bei normotensiven Ratten nach der s.c. Behandlung mit Vehikel (○) oder Candesartan 3 mg/kg (▽) auf das Ausmaß nach Okklusion der A. cerebri media (MCAO) von 90 min. Die Behandlung wurde 24 h nach MCAO-Induktion begonnen. (A) Das Bewertungsmodell des neurologischen Defizit mit einer Scala von 1-3 nach Bederson et al. (1986) wurde benutzt. Zu berücksichtigen ist, dass Ratten mit einem besser neurologischen Status einen niedrigeren neurologischen Messwert haben. (B) Bewertungsmodell des neurologischen Defizit mit einer Scala von 3-18 nach Garcia et al. (1995) wurde benutzt. Ratten mit einem besseren neurologischen Status erhielten einen höheren Messwert. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm SEM (Standardwert) dargestellt. Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen beobachtet werden.

3.4. Infarktvolumen

Die Größe des ischämischen Infarkts wurde mit Hilfe der Cresylviolett-Färbung 2 und 7 Tage nach MACO mit Reperfusion bestimmt. Die Zytoarchitektur der kontralateralen Hemisphäre des Kortex war normal. Zwei Tage nach fokaler ischämischer Infarkt konnten, in der Hemisphäre der Okklusion, klare Bereiche mit verletztem Gewebe als Flächen der Blässe ausgemacht werden. Diese konnten deutlich vom benachbarten Gewebe abgegrenzt werden. Die ischämischen Läsionen erstreckten sich über das Versorgungsgebiet der Arteria cerebri media einschließlich des frontoparietalen und frontotemporalen Kortex sowie über das laterale und mediale Segment des Putamens. Die systemische Gabe von 3 mg/kg Candesartan, beginnend 3 h nach Gehirnschämie, führte zu keiner Verminderung des Infarktvolumens. Der Kortex zeigte bei den Tieren 7 Tage nach durchgeführter MCAO im Infarktgebiet Löcher unterschiedlicher Größe, nekrotische Areale, die als Blässe ausgemacht werden konnten, sowie ausgedehnte, inhomogene Ansammlungen von Zellen im Bereich des Infarktkernes und peripherer Regionen. Diese Ansammlungen von Zellen bildeten Knoten mit unterschiedlicher Dichte. Nur wenige Zellen konnten im blassen Bereich gefunden werden. Auch hier konnte man mit Candesartan der Dosierung von 3 mg/kg keine Reduktion des Infarktvolumens erzielen. Bei spätem Beginn der Therapie (24 h nach MCAO) hatte der AT₁-Rezeptorantagonist ebenfalls keinen Effekt auf die Größe des Infarktvolumens im Vergleich zu den Vehikeltieren (Abb. 10 A u. B).

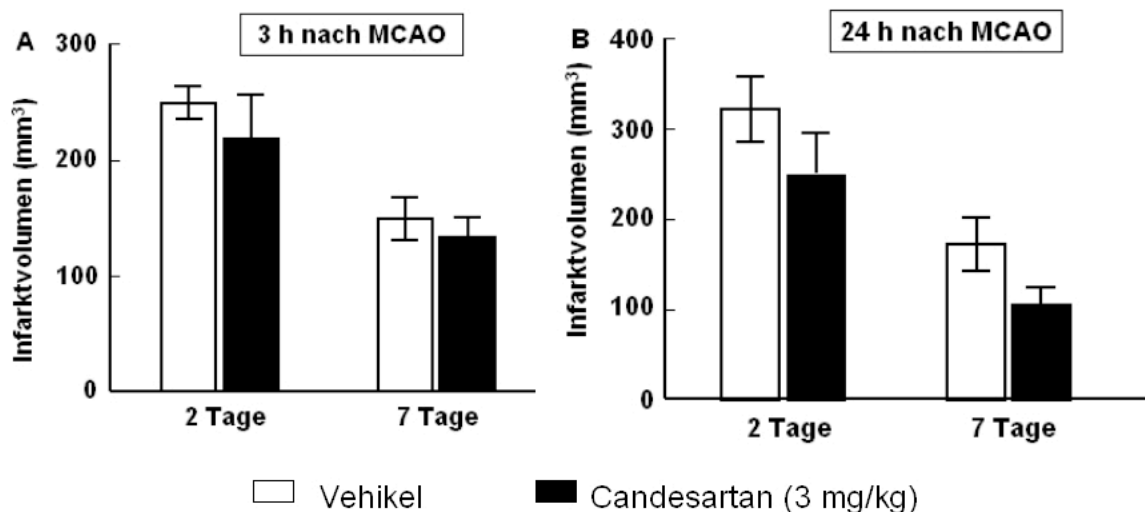


Abb. 10 (A) Die Effekt der s.c. Behandlung mit Vehikel (■) oder Candesartan 3 mg/kg (□) auf das Ausmaß des Infarktvolumen 2 und 7 Tage nach Okklusion der A. cerebri media (MCAO) für 90 min. Die Behandlung wurde 3 h (A) oder 24 h (B) nach MCAO-Induktion begonnen. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm SEM (Standardwert) dargestellt.

3.5. Das Hirnödem

Auch das Hirnödem wird, wie das Infarktvolumen, durch die Behandlung mit 3 mg/kg Candesartan nicht positiv beeinflusst. Es wurden keine Unterschiede im Ausmaß des Ödems zu den Kontrolltieren festgestellt (Abb. 11).

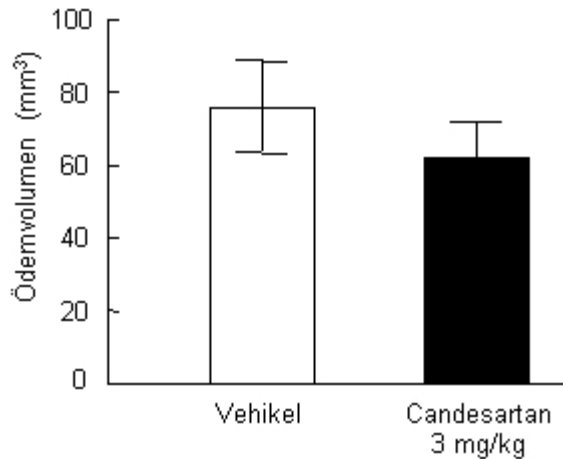


Abb. 11 Effekte der s.c. Behandlung mit Vehikel (■) oder Candesartan 3 mg/kg (□) auf das Ödemvolumen 2 Tage nach Okklusion der A. cerebri media (MCAO) für 90 min. Die Behandlung wurde 3 h nach MCAO-Induktion begonnen. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm SEM (Standardwert) dargestellt.

3.6. Immunhistochemische Detektion von Apoptose und inflammatorischer Antwort

3.6.1. Detektion apoptotischer Prozesse mittels "TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling"

TUNEL

Die Detektion apoptotischer Prozesse wurde mit Hilfe einer immunhistochemischen Färbung für TUNEL durchgeführt.

Sowohl zwei als auch sieben Tage nach MCAO mit Reperfusion konnten vermehrt TUNEL-positive Zellen im Bereich des Peri-Infarktes, der Penumbra und des parietalen Kortex detektiert werden. Eine Behandlung mit Candesartan, beginnend 3 h nach MCAO verminderte signifikant die Zahl TUNEL-positiver Zellen im Vergleich zu Vehikel-behandelten Tieren. Dieser Effekt war besonders deutlich 2 Tage nach MCAO, war aber auch 7 Tage nach MCAO zu beobachten (Abb.12). Eine TUNEL-Färbung zeigte sich hauptsächlich in den Zellen, die eine Morphologie degenerierter Neurone aufwiesen.

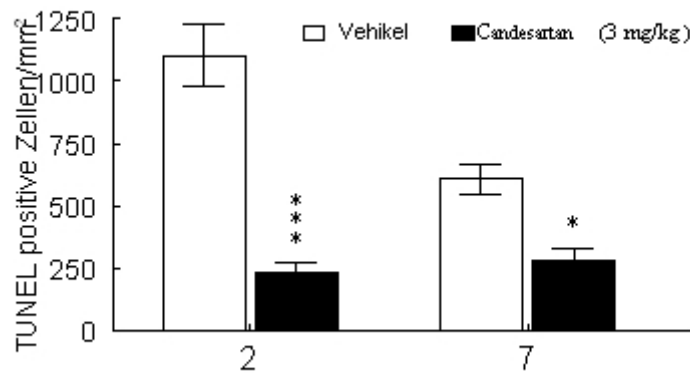


Abb. 12 Ausmaß der Apoptose bei s.c. Behandlung mit Vehikel (□) oder Candesartan 3 mg/kg (■) mit Hilfe der Detektion TUNEL-positiver Zellen im Bereich des Peri-Infarktes, der Penumbra und des parietalen Kortex 2 und 7 Tage nach MCAO nach Okklusion der A. cerebri media (MCAO) für 90 min. Die Behandlung wurde 3 h nach MCAO-Induktion begonnen. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm SEM (Standardwert) dargestellt.

Auch bei einem verzögerten Beginn der Therapie (24 h nach MCAO) mit Candesartan (3 mg/kg/Kg) konnte eine signifikante Reduktion von TUNEL-positiven Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe verzeichnet werden (Abb. 13). In keiner der Gruppen konnten TUNEL-positive Zellen in der kontralateralen Hemisphäre detektiert werden.

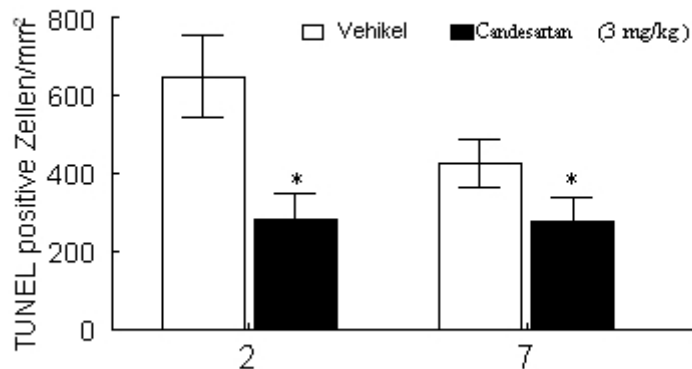


Abb. 13 Ausmaß der Apoptose bei s.c. Behandlung mit Vehikel (□) oder Candesartan 3 mg/kg (■) mit Hilfe der Detektion TUNEL-positiver Zellen im Bereich des Peri-Infarktes, der Penumbra und des parietalen Kortex 2 und 7 Tage nach MCAO nach Okklusion der A. cerebri media (MCAO) für 90 min. Die Behandlung wurde 24 h nach MCAO-Induktion begonnen. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm SEM (Standardwert) dargestellt.

3.6.2. Detektion antiinflammatorischer Prozesse mit Hilfe ED-1 positiver Zellen (aktivierte Mikroglia und Makrophagen)

Die Okklusion der MCA verursachte eine inflammatorische Antwort. Zwei Tage nach MCAO mit Reperfusion zeigten sich bei der histologischen Untersuchung größere Ansammlungen von ED-1 positiven Zellen (aktivierte Mikroglia und Makrophagen) im Bereich der Peripherie des Infarktareals. Zu einem geringeren Ausmaß konnte man dies auch im Bereich der Ischämie beobachten. Aktivierte Mikrogliazellen vom amoeboiden Typ, die man durch ihre Größe erkennen kann, zeigten sich hauptsächlich im Bereich der Grenze des Infarktes. Eine Behandlung mit Candesartan beginnend 3 h nach MCAO führte zu keiner Änderung der Zahl ED-1 positiver Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 14). Nach späterem Behandlungsbeginn (24 h nach MCAO) mit Candesartan konnte eine leichte, aber signifikante Reduktion der ED-1 positiven Zellen beobachtet werden (Abb. 15). Die histologischen Untersuchungen sieben Tage nach MCAO zeigten jedoch deutliche und signifikante Unterschiede im Ausmaß der ED-1 positiven Zellen zwischen den Candesartan-behandelten Tieren und der Kontrollgruppe.

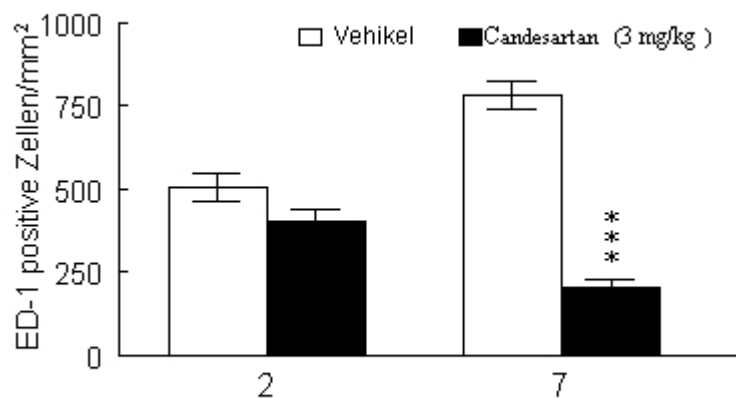


Abb. 14 Abb. Ausmaß entzündlicher Prozesse nach s.c. Behandlung mit Vehikel (□) oder Candesartan 3 mg/kg (■) mit Hilfe der Detektion ED-1 positiver Zellen im Bereich des Peri-Infarktes, der Penumbra und des parietalen Kortex 2 und 7 Tage nach MCAO nach Okklusion der A. cerebri media (MCAO) für 90 min. Die Behandlung wurde 3 h nach MCAO-Induktion begonnen. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm SEM (Standardwert) dargestellt.

Sowohl ein früher (3 h nach MCAO) als auch ein verzögerter Beginn (24 h nach MCAO) der Therapie mit Candesartan (3 mg/kg/Kg) verminderte sieben Tage nach MCAO die Zahl ED-1 positiven Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 14 u. 15).

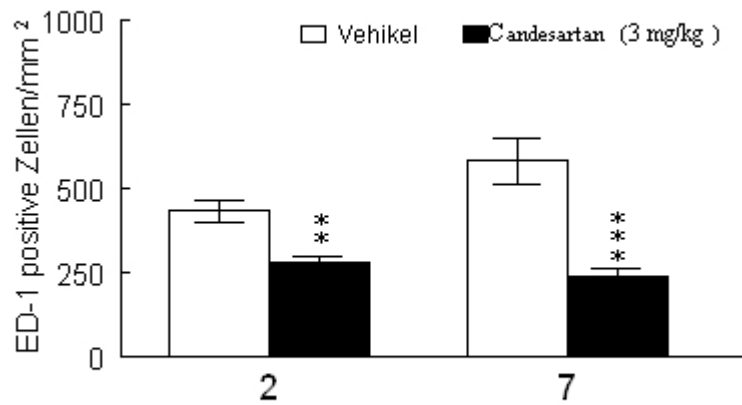


Abb. 15 Ausmaß entzündlicher Prozesse nach. s.c. Behandlung mit Vehikel (□) oder Candesartan 3 mg/kg (■) mit Hilfe der Detektion ED-1 positiver Zellen im Bereich des Peri-Infarktes, der Penumbra und des parietalen Kortex 2 und 7 Tage nach MCAO nach Okklusion der A. cerebri media (MCAO) für 90 min. Die Behandlung wurde 24 h nach MCAO-Induktion begonnen. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm SEM (Standardwert) dargestellt.

4. Diskussion

Zur Prävention des Schlaganfalls mit AT₁-Rezeptorantagonisten gibt es bereits einige Daten aus klinischen und tierexperimentellen Studien. Diese verdeutlichen den Stellenwert der Behandlung mit AT₁-Rezeptorantagonisten.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit folgenden Fragestellungen und Zusammenhängen zur Optimierung der Behandlung eines akuten Schlaganfalls mit einem AT₁-Rezeptorantagonisten:

- Wann ist der optimale Zeitpunkt um die Therapie mit einem AT₁-Rezeptorantagonisten zu beginnen?
- Welche Dosierung des Antagonisten sollte gewählt werden?
- Wie ist das Ausmaß der zentralen Blockade des AT₁-Rezeptors?
- In welchem Ausmaß wird der Blutdruck gesenkt und welche Auswirkungen hat dies?

Diese Fragen wurden im Rahmen dieser Arbeit und den tierexperimentellen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe von Brdon et al. (2007) erörtert.

In der vorliegenden Arbeit konnte nur durch einen frühen Beginn der Behandlung mit dem AT₁-Rezeptorantagonisten Candesartan (3 h nach MCAO) eine Verbesserung des neurologischen Defizits, aber keine Reduktion des Infarktvolumens gemessen werden. Nach spätem Beginn der Behandlung mit Candesartan (24 h nach MCAO) konnte kein Effekt auf das neurologische Defizit oder das Infarktvolumen beobachtet werden. Es ist anzunehmen, dass die Dosierung 3 mg/kg zwar zu einer suffizienten und über 24 h andauernden Blockade des AT₁-Rezeptors führt, jedoch aufgrund der gemessenen Senkung des Blutdrucks in der Phase der Reperfusion zu keiner Reduktion des Infarktvolumens geführt hat. Der AT₁-Rezeptorantagonist Candesartan war aufgrund der akuten Behandlung mit der hier gewählten Dosis nicht in der Lage, die zerebrovaskuläre Autoregulation auf ein niedrigeres Druckniveau zu führen, um eine adäquate Perfusion des Gehirns auch bei niedrigen Blutdruckwerten zu gewährleisten. Trotzdem zeigte sich eine signifikant geringe Detektion apoptotischer Prozesse sowie eine geringere Invasion inflammatorischer Zellen nach Behandlung mit Candesartan.

4.1. Tierexperimentelle Untersuchungen

4.1.1. Prävention des Schlaganfalls durch systemische Behandlung mit AT₁-Rezeptorantagonisten

Zur Prävention des Schlaganfalls gibt es bisher einige tierexperimentelle Untersuchungen: Es wurden Untersuchungen an der Salz-belasteten spontan hypertensiven Ratte (stroke prone spontaneously hypertensive rat - SHRSP) zu dieser Thematik durchgeführt. Es ist bei diesen Tieren bekannt, dass ein erhöhter Blutdruck zu Endorganschäden, wie Nierenschädigung mit Proteinurie, Linksherzhypertrophie und erhöhter Schlaganfallinzidenz führt. Durch die systemische Behandlung mit einem AT₁-Rezeptorantagonisten konnte dieser Verlauf abgeschwächt bzw. vermieden werden.

In einer Studie von Inada et al. (1997) wurde der AT₁-Rezeptorantagonist Candesartan mit dem ACE-Hemmer Enalapril verglichen. Bei beiden Studienarmen konnte eine Reduktion des Blutdruckes, der Schlaganfallinzidenz sowie der Proteinurie beobachtet werden. Wenn die Behandlung mit einer niedrigen Dosierung Candesartan (0,1 mg/kg) durchgeführt wurde, war ebenfalls eine Reduktion der Schlaganfallinzidenz sowie der Proteinurie zu beobachten ohne sich auf den Blutdruck auszuwirken.

Positive Effekte durch die systemische Gabe eines AT₁-Rezeptorantagonisten ohne deutliche Reduktion des Blutdruckes konnte auch in weiteren Studien gezeigt werden (Ito et al. 2000, Sironi et al. 2004). Bei der Fütterung einer salzhaltigen Diät zeigte sich bei den SHRSP ein deutlich erhöhtes Auftreten eines Schlaganfalls. Durch eine Gabe eines AT₁-Rezeptorantagonisten war die Inzidenz eines ischämischen Infarktes signifikant niedriger (Sironi et al. 2004). Außerdem zeigte sich durch die Behandlung mit Valsartan sowohl eine Reduktion von zerebraler Entzündungsreaktion als auch eine Reduktion der Aktivität der zerebralen NADP-Oxidase und der Menge reaktiven Sauerstoff-Species (ROS) im Vergleich zur Behandlung mit Hydralazin (Yamamoto et al. 2008).

Eine systemische Vorbehandlung über 4 Wochen führte die Arbeitsgruppe von Lu et al. (2005) bei der spontan hypertensiven Ratten (SHR) durch. Den SHR wurde nach Vorbehandlung (Candesartan vs. Ramipril) ein Schlaganfall mit Hilfe der MCAO zugefügt. Hier zeigten sich neuroprotektive Effekte durch die Behandlung mit Candesartan. Die Herunterregulation der AT₁-Rezeptorexpression, die Hochregulation des AT₂-Rezeptors sowie die Effekte durch die Blockade des AT₁-Rezeptors wurden als Ursache dafür vermutet, was sich auch durch die vorgelegte Studie weiter erhärtet.

Zhou et al. (2005) verglich SHR mit normotonen Wistar Ratten. Es wurde eine Behandlung mit Candesartan vs. Vehikel durchgeführt. Eine Gabe von Candesartan (0,3 mg/kg/Tag) bzw. Vehikel wurde über eine subcutan implantierte Minipumpe über 4 Wochen durchgeführt und man beobachtete antiinflammatorische Effekte nach Behandlung mit dem AT₁-Rezeptorantagonisten Candesartan. Diese Studie lässt vermuten, dass proinflammatorische Effekte von ANG II im Bereich der zerebralen Mikrogefäße durch den AT₁-Rezeptor vermittelt werden und ein AT₁-Rezeptorantagonist ein potentiell Medikament zur Therapie von ischämischen und entzündlichen Erkrankungen des Gehirns ist. Ein deutlich höheres Auftreten von Entzündungsmediatoren (TNF- α , NF- κ B etc.) konnte bei den SHR im Vergleich zu den Wistar Ratten nachgewiesen werden, jedoch zeigt sich nach Behandlung in beiden Gruppen eine Normalisierung der Entzündungsmediatoren im Bereich der Mikrogefäße. Es wurde zudem eine Senkung des Blutdruckes in beiden Studienarmen nach Behandlung mit Candesartan beobachtet. Bei der SHR wurden die Blutdruckwerte in den Normbereich gesenkt, bei den Wistar Ratten zeigte sich eine leichte Senkung des Blutdruckes. Es ist anzunehmen, dass nicht nur die SHR von einer Behandlung mit einem AT₁-Rezeptorantagonisten profitieren kann.

Zu den peripheren Effekten gehört unter anderem die zerebrovaskuläre Autoregulation. Sie ist für die Aufrechterhaltung einer adäquaten Blutversorgung des Gehirns zuständig, auch dann, wenn es zu peripheren Blutdruckschwankungen kommt. Ein starker Blutdruckanstieg während eines ischämischen Infarktes führt zu einer Schädigung des Hirngewebes. Jedoch kann auch der akute Abfall des MAP zu

einer Minderperfusion der Marginalzone des Infarktes führen. Durch eine moderate Blutdrucksenkung und eine Senkung der zerebrovaskulären Autoregulation auf ein niedrigeres Blutdruckniveau kann eine Minderperfusion im Bereich der Marginalzone, der Penumbra, verhindert werden und somit das Infarktvolumen und das zentrale Ödem günstig beeinflusst werden. Diese Senkung führt zu einem geringeren Infarktvolumen (Nishimura et al. 2000b, Ito et al. 2002). Eine Veränderung der zerebrovaskulären Autoregulation ist jedoch nicht durch eine Kurzzeitbehandlung zu erreichen (Groth et al. 2003, Lou et al. 2004). Die Modulation der Gefäßmedia ist für die Prävention eines Schlaganfalls von Bedeutung. Eine Langzeitbehandlung mit Candesartan reduziert nicht nur die Dicke der Gefäßmedia der MCA, sondern auch die Entzündungsreaktion im Bereich der Mikrogefäße (Nishimura et al. 2000b, Ito et al. 2002, Zhou et al. 2005). Da ANG II deutliche proinflammatorische Wirkungen im Bereich der Gefäßwand zeigt und die Produktion von reaktiver Sauerstoff-Species (ROS), inflammatorischen Zytokinen und Adhäsionsmolekülen induziert, kann durch die Behandlung mit einem AT₁-Rezeptorantagonisten eine antiinflammatorische Wirkung erzielt werden (Sironi et al. 2004, Yamamoto et al. 2008, Zhou et al. 2005). Die Angiogenese ist ein Mechanismus, der für die Aufrechterhaltung der Blutversorgung eine große Rolle spielt. Die Langzeitbehandlung mit Losartan im Trinkwasser bei der normotensiven Ratte zeigt, dass hier die zerebrale Angiogenese verbessert, der Blutfluss aufrechterhalten und die Infarktgröße deutlicher reduziert wurde als in der Kontrollgruppe (Forder et al. 2005).

Im Gegensatz zu einer Langzeit-Vorbehandlung konnte durch eine akute i.v. Vorbehandlung (4h vor MCAO) mit Candesartan der neurologische Status, das Infarktvolumen sowie die Größe des Ödems nicht beeinflusst werden. Ein Grund für die ausbleibende Wirkung des AT₁-Rezeptorantagonisten bei der akuten Gabe könnte der ausgeprägte Blutdruckabfall während der Ischämiephase bei gleichzeitig fehlender Verschiebung der zerebralen Autoregulation auf niedrigeres Blutdruckniveau sein, wie auch die vorgelegte Studie vermuten lässt. Ein weiterer Studienarm zeigt nach einer systemischen Vorbehandlung über 5 Tage vor Schlaganfall mittels MCAO sowohl die Senkung des MAP als auch eine Senkung von Schlaganfallausmaß, Ödem und eine Verbesserung des neurologischen Status (Groth et al. 2003).

Es ist wichtig zu betonen, dass all die in diesem Kapitel beschriebenen positiven Effekte der AT₁-Rezeptorantagonisten auf die Blockade der peripheren AT₁-Rezeptoren zurück zu führen sind.

Die genannten Studien zeigen, dass eine Senkung des Blutdrucks durch einen AT₁-Rezeptorantagonisten zu einem der wichtigsten Faktoren in der Schlaganfallprävention gehört (von Lutterotti et al. 1992, Inada et al. 1997), ein akuter Abfall des Blutdrucks kurz vor oder während des Schlaganfalls aber eher von Nachteil ist.

4.1.2. Prävention des Schlaganfalls durch Blockade der AT₁-Rezeptoren im Gehirn

Verschiedene Studien haben bisher gezeigt, dass eine ausschließliche Blockade der zentralen AT₁-Rezeptoren entweder durch eine i.c.v. Gabe oder eine intracisternale Applikation von AT₁-Rezeptorantagonisten zu einer Reduktion von post-ischämischer Entzündungsreaktion sowie einer Verminderung der Apoptose im Bereich der Infarktperipherie und damit zu einer Verbesserung des neurologischen Status und Reduktion des Infarktvolumens führt (Dai et al. 1999, Yamakawa et al. 2003, Lou et al. 2004).

Bei der Studie von Dai et al. (1999) sollte die Hypothese untersucht werden, ob eine zentrale Hemmung des AT₁-Rezeptors zu einem verbesserten neurologischen Status führt. Der Nachweis der AP-1 Transkriptionsfaktoren c-Fos und c-Jun, die mit programmiertem Zelltod und Neurodegeneration assoziiert sind, sollte das Ausmaß an Apoptose widerspiegeln. Es zeigte sich ein Zusammenhang zwischen neurologischem Status und Expression von c-Fos und c-Jun. Eine i.c.v. Vorbehandlung mit Irbesartan vermindert die Expression dieser Apoptosemarker. In der Studie von Lou et al. (2004) wurden Ratten vor sowie nach MCAO mit Irbesartan behandelt. Bei einer i.c.v. Vorbehandlung mit Irbesartan verbesserten sich nach Ischämie die motorischen Fähigkeiten, zudem wurde das Infarktvolumen gesenkt. Im Vergleich dazu verbesserten sich die sensorischen Fähigkeiten bei einer i.c.v. Nachbehandlung. Es ist wichtig zu betonen, dass in diesen Untersuchungen die peripheren AT₁-Rezeptoren nicht blockiert werden.

4.1.3. Akute Behandlung des Schlaganfalls mit AT₁-Rezeptorantagonisten

Bei der akuten Behandlung des Schlaganfalls mit einem AT₁-Rezeptorantagonisten sind die Blockade der AT₁-Rezeptoren im Gehirn und die damit verbundenen Mechanismen von besonderer Bedeutung. Die unter 4.1.1. genannten systemischen Effekte von AT₁-Rezeptorantagonisten benötigen einen längeren Zeitraum der Behandlung. Daher kommen sie für die Wirkmechanismen bei der akuten Gabe eines AT₁-Rezeptorantagonisten kurz nach einem Schlaganfall nicht in Betracht.

Penetration von AT₁-Rezeptorblockern durch die Bluthirnschranke

Die Penetration durch die Blut-Hirn-Schranke ist für die Behandlung mit einem AT₁-Rezeptorantagonisten Candesartan nach Schlaganfall in dem hier vorgelegten Modell offensichtlich die Voraussetzung für einen positiven Effekt. Candesartan hemmt nach systemischer Gabe dosis- und zeitabhängig die AT₁-Rezeptoren im Gehirn, wie die Hemmung der durch i.c.v. Injektion von ANG II induzierten Vasopressin-Freisetzung, des Blutdruckanstiegs und des Trinkverhaltens zeigen (Gohlke et al. 2002a und 2002b). Schon mit einer niedrigen Dosis von 0,1-1 mg/kg Candesartan (i.v.) beobachtet man, dass die zentralen Effekte von ANG II inhibiert werden. Die nötige Dosis zur kompletten Hemmung der zentralen AT₁-Rezeptoren über 24 Stunden beträgt 1-10 mg/kg (Gohlke et al. 2002a). Die Daten zeigen, dass nach systemischer Gabe Candesartan eine langandauernde und suffiziente Blockade des zentralen AT₁-Rezeptors bewirkt. Es ist anzunehmen, dass die Dosierung von 3 mg/kg, die in dieser Studie verwendet wurde, zwar vollständig die Rezeptoren im Gehirn hemmt, aber

aufgrund der gemessenen Senkung des Blutdruckes in der Phase der Reperfusion zu keiner Reduktion der Infarktgröße geführt hat. Brdon et al. (2007) zeigten, dass eine Reduktion des Infarktvolumens nur dann zu beobachten war, wenn eine niedrige Dosis (0,3 mg/kg) gewählt wurde, die den zentralen AT₁-Rezeptor blockierte, jedoch nur eine moderate Blutdrucksenkung bewirkte.

Nach peripherer Gabe penetriert auch Telmisartan die Blut-Hirn-Schranke und führt zu einer selektiven Blockade des AT₁-Rezeptors. Da eine hochdosierte Gabe des Antagonisten, i.e., 10 mg/kg i.v. und 30 mg/kg p.o., zu einer nahezu kompletten und anhaltenden Hemmung des AT₁-Rezeptor im Gehirn führt (Gohlke et al. 2001), wurde bei den Untersuchungen zum hämorrhagischen Infarkt von Jung et al. (2007) eine Hochdosistherapie durchgeführt, um die therapeutischen Effekte zu untersuchen. Die mit Telmisartan behandelten Tiere zeigten geringer ausgeprägte neurologische Defizite und eine besser Rekonvaleszenz. Der MAP zeigte sich 6 h nach Medikamentenapplikation leicht reduziert, jedoch nicht signifikant. Telmisartan scheint nach hämorrhagischem Infarkt zu einer neuronalen Protektion mit antiinflammatorischen, antiapoptotischen und antioxidativen Wirkungen zu führen.

Bedeutung der Blutdrucksenkung nach akuter Gehirnischämie

Der Vorteil der hohen Dosierung von Candesartan ist die langanhaltende und komplette Blockade des zentralen AT₁-Rezeptors (Gohlke et al. 2002 a und b). Dieser Vorteil wird jedoch durch den schädigenden Einfluss des akuten Blutdruckabfalls offensichtlich wieder aufgehoben, wie zuvor beschrieben.

Unsere Untersuchungen zeigte eine Narkose-bedingte generelle Reduktion des Blutdruckes während der MCAO, mit einem allmählichen Anstieg des Blutdruckes in der Phase der Reperfusion. Kozak et al. (2008) führten ebenfalls Untersuchungen zur akuten Behandlung mit Candesartan vs. Vehikel nach Schlaganfall durch. Sie untersuchten bei der SHR den Zusammenhang zwischen Dosis, damit verbundener Senkung des MAP und dem neurologischen Status, Infarktvolumen und zentralem Ödem. Es konnte eine dosisabhängige Verbesserung des neurologischen Defizits festgestellt werden; Hirnödem und Infarktvolumen reduzierten sich nur bei den beiden niedrigeren Dosierungen (0,1 mg/kg u. 0,3 mg/kg). Bei der in dieser Studie gewählten hohen Dosierung (1 mg/kg) konnte man lediglich ein verbessertes neurologisches Defizit feststellen, jedoch keine Reduktion des Infarktvolumens oder des Hirnödems, was auf einen zu starken Abfall des MAP unter die Normkurve in dieser Gruppe zurückzuführen ist.

Bei einer Arbeit von Fagan et al. (2006) wurde die Narkose nur zu Beginn der induzierten zerebralen Ischämie für 10 min durchgeführt, im Anschluss waren die Ratten bei vollem Bewusstsein. Die Folge war ein schneller Anstieg des Blutdruckes und nur ein verlangsamtes Absinken in der Phase der Reperfusion. Unter diesen experimentellen Bedingungen führte eine i.v. Gabe von Candesartan unmittelbar mit dem Beginn der Reperfusion den erhöhten Blutdruck zurück in den Normbereich. Trotz der Senkung des Blutdrucks stellten sich unter diesen Bedingungen eine Reduktion des Infarktvolumens sowie eine Verbesserung des neurologischen Defizits ein. In der Mehrzahl der

übrigen experimentellen Studien zum ischämischen Schlaganfall standen die Tiere während der gesamten Periode der MCAO unter Narkose, wie auch in unserem Studienaufbau.

Bedeutung des Zeitpunktes beim Beginn der Therapie

Der neurologische Status spiegelt deutlich Einschränkungen und Auswirkungen eines Schlaganfalls wider. Der neurologische Status verbesserte sich beim Schlaganfall in den vorliegenden

Untersuchungen nur dann deutlich, wenn die Therapie 3 h nach MCAO, jedoch nicht, wenn sie nach 24 h begonnen wurde.

Es zeigten sich Unterschiede zwischen der motorischen und der sensorischen Funktionsfähigkeit nach zerebraler Ischämie. Während die Sensomotorik sich in den ersten 3-4 Tagen deutlich verbesserte, konnte man keine oder nur zu einem geringen Grad verbesserte motorische Funktionen beobachten. An den Tagen 4-5 nach MCAO konnten keine weiteren Verbesserungen im Bereich der Sensomotorik festgestellt werden, aber die Motorik besserte sich in einem größeren Ausmaß, als es bei den Kontrolltieren zu beobachten war. Vergleichbare Ergebnisse konnten auch bei Tieren, die mit 0,3 mg/kg Candesartan behandelt wurden, beobachtet werden (Brdon et al. 2007). Diese Diskrepanz zwischen der Regeneration der Motorik und der Sensomotorik wurde auch bereits bei Ratten beschrieben, die vor zerebraler Ischämie mit Irbesartan i.c.v. behandelt wurden (Lou et al. 2004). Aktuell gibt es hierzu noch keine Erklärung.

Ein später Beginn der Behandlung (24 h nach MCAO) brachte auch in Bezug auf das Infarktvolumen in der vorliegenden Studie keine Vorteile für die Tiere. Die Ergebnisse von Engelhorn et al. (2004) zeigten im Gegensatz dazu neben einem verbesserten neurologischen Status auch eine Reduktion des Infarktvolumens. Der Grund hierfür könnte im unterschiedlichen Aufbau der Studien liegen. Beim Studiendesign von Engelhorn et al. (2004) wurde die MCA nur für eine Stunde okkludiert, dies bewirkte einen kleineren Infarkt im Vergleich zu unserem Studienaufbau, in dem wir die MCA für 1,5 h okkludierten. Man könnte annehmen, dass der verzögerte Beginn der Therapie (24 h nach MCAO) mit einem AT₁-Rezeptorblocker bei einem leichten ischämischen Insult einen positiven Effekt bewirkt, jedoch nicht bei Ratten, die unter dem Ausmaß einer großen Ischämie leiden.

4.1.4. Neuroprotektive Wirkung der AT₁-Rezeptorantagonisten im Gehirn

Hemmung der Inflammation und Apoptose

Ogleich für die Pathogenese des Schlaganfalls unterschiedliche Mechanismen bekannt sind, gibt es Hinweise, dass die Entzündungsreaktion sowie die Apoptose für das Ausmaß des Infarktes eine besondere Rolle spielen. Arbeiten auf dem Gebiet des experimentellen Schlaganfalls und der zerebralen Ischämie haben den Zusammenhang zwischen inflammatorischer Antwort und nekrotischen Hirnveränderungen gezeigt (Doyle et al. 2008, Wang et al. 2007). Bei einer ausgeprägten inflammatorischen Reaktion beobachtet man das Einwandern von Leukozyten ins zerebrale Parenchym sowie die Aktivierung endogener Mikroglia als Folge einer zerebralen Ischämie (Becker 1998, Davies et al. 1998). Die Unterbrechung des zentralen Blutflusses führt zum Verlust von Energie

im Bereich des Parenchyms und zur Degeneration von Neuronen. Dies kann eine Immunantwort auslösen und führt zur Aktivierung und Einwanderung von inflammatorischen Zellen. Inflammatorische Zellen führen zu einer Freisetzung und Aktivierung einer Reihe von zytotoxischen Stoffe, wie Zytokine, Matrix Metalloproteasen (MMPs) und Stickstoffmonoxid (NO).

Lou et al. (2004) benutzten zur Detektion von apoptotischen Prozessen TUNEL sowie PARP p85, um die Effekte einer Irbesantantherapie zu messen. Beides sind zuverlässige Methoden um Apoptose zu detektieren. In der vorliegenden Studie wurde nur ein Nachweis von Apoptose mittels TUNEL durchgeführt, nachdem Versuche mit PARP sowie Caspase 3-Antikörpern aufgrund unspezifischer Färbungen auf der kontralateralen Gehirnhälfte nicht auswertbar waren. Die Verwendung von nur einer Methode zum Nachweis von Apoptose stellt sicher eine Schwachstelle der vorgelegten Daten dar und bleibt zu diskutieren, dies gilt auch für die Detektion der Entzündungsreaktion durch den Nachweis aktivierter Mikroglia.

Es zeigt sich, dass frühzeitig nach einem Perfusionsdefizit (nach Minuten bis Stunden) Apoptose detektiert werden kann, jedoch entzündliche Prozesse erst mehrere Tage nach einer Ischämie zu verzeichnen sind. Der Bereich der Penumbra ist eine besondere Zone. Sie kann als Region definiert werden, in der ein gewisses Energiestadium noch bewahrt ist, jedoch die Proteinsynthese bereits supprimiert ist (Lou et al. 2004). Die Penumbra ist somit eine Zone, die das Infarktvolumen und die Ödemgröße und damit das Ausmaß der Schädigung mit beeinflusst.

Indirekte Aktivierung des AT₂-Rezeptors

Aufgrund von experimentellen Ergebnissen (Li et al. 2005, Lu et al. 2005, Sugawara et al. 2005) kann angenommen werden, dass der AT₂-Rezeptor eine große Bedeutung für die neuroprotektive Wirkung von AT₁-Rezeptorenantagonisten hat. Der AT₂-Rezeptor wird aufgrund der hohen Selektivität der AT₁-Rezeptorenantagonisten nicht gehemmt, sondern in Gegenteil durch die steigende ANG II-Konzentration im Blut verstärkt stimuliert. Die Dichte an AT₁-Rezeptoren ist in den meisten Geweben um ein Vielfaches höher als die Dichte der AT₂-Rezeptoren. Der AT₂-Rezeptor vermittelt mehrere potentiell vorteilhafte Effekte wie Vasodilatation, neuronale Regeneration und Differenzierung. AT₁-Rezeptorenantagonisten wie Candesartan scheinen durch die Blockade des AT₁-Rezeptors nicht nur den AT₁-Rezeptor herunter zu regulieren, sondern auch für eine Hochregulation des AT₂-Rezeptors zu sorgen (Lu et al. 2005). Die Situation ändert sich zudem, wenn Gewebe Umbauprozesse durchmachen, wie beim Herzinfarkt, chronischen Nierenerkrankungen, kutaner Wundheilung sowie dem ischämischen Schlaganfall. Unter diesen Bedingungen kommt es zu einer erhöhten Expression von AT₂-Rezeptoren. Man kann annehmen, dass diese AT₂-Rezeptoren Erhöhung zu einem der körpereigenen Schutzmechanismen gehört (Steckelings et al. 1992b).

Zusätzlich kann eine Stimulation der AT₂-Rezeptoren im Gehirn die Genesung nach fokal zerebraler Ischämie möglicherweise verbessern (Li et al. 2005, Lu et al. 2005, Sugawara et al. 2005).

4.2. Klinische Studien zur Prävention und Behandlung des Schlaganfalls

Die aktuellen Empfehlungen der amerikanischen Stroke Association raten zur Zurückhaltung, was die Senkung des Blutdrucks beim akuten Schlaganfall angeht, mit Ausnahme von bedenklich erhöhtem Blutdruck. Der Hypertonus stellt einen der potentesten vasotoxischen Zustände dar.

Klinische Studien wie die LIFE- und die SCOPE-Studie haben die Langzeitnutzen einer Behandlung mit AT₁-Rezeptorantagonisten gezeigt (Dahlöf et al. 2002, Lithell et al. 2003). AT₁-Rezeptorenantagonisten zeigen eine primäre sowie sekundäre Schlaganfallvorbeugung. Dies wird in der MOSES-Studie verdeutlicht, die den Ca⁺-Kanalblocker Nitrendipin mit dem AT₁-Rezeptorenantagonisten Eprosartan bei Hochrisikopatienten mit Z.n. Schlaganfall als Sekundär-Prophylaxe verglich. Dabei zeigte sich eine signifikante Reduktion von kardiovaskulären sowie zerebrovaskulären Ereignissen in den folgenden 24 Monaten in der Gruppe der Eprosartan-behandelten Patienten (Schrader et al. 2003).

Die ACCESS-Studie ist eine prospektive, doppel-blind, placebo-kontrollierte, randomisierte, multizentrische PhaseII-Studie, in die 500 Patienten mit Schlaganfall eingeschlossen wurden. Das Ziel war es, die Blutdruckwerte in den ersten 24 h um 10-15 % zu senken. Am ersten Tag wurde die Therapie mit einer Startdosis von Candesartan Cilexetil 4 mg bzw. einem Placebo begonnen. Bei Blutdruckwerten von > 160 mm Hg systolisch bzw. >100 mm Hg diastolisch wurde die Dosis am zweiten Tag auf 8 mg bzw. 16 mg erhöht. Am siebten Tag wurde eine 24-h Blutdruckmessung bei allen Patienten durchgeführt.

Die Morbidität und Mortalität der mit Candesartan Cilexetil-behandelten Patienten war signifikant niedriger im Vergleich zu der Gruppe der Patienten, die mit einem Placebo behandelt wurden. Es ist zudem von erheblicher klinischer Bedeutung, dass es unter Senkung des Blutdruckes durch Candesartan Cilexetil zu keinen kardiovaskulären sowie zerebralen Ereignissen kam.

Interessant ist, dass sich kein positiver Effekt bei den Patienten verzeichnen ließ, bei denen die Behandlung 7 Tage nach Schlaganfall begonnen wurde.

Es ist bekannt, dass die Senkung des Blutdrucks ein wichtiges Element der primären Prävention des Schlaganfalls darstellt. Dies ist durch zahlreiche klinische, randomisierte Studien bewiesen. Es wird im Gegensatz dazu noch immer diskutiert, welchen Stellwert das Blutdruckniveau auf das neurologische Defizit nach einem akuten Schlaganfalls hat. Die Mehrheit der Studien zeigt, dass ein hoher Blutdruck bei Eintreffen in das Krankenhaus in der Regel mit einem höheren Risiko für das Versterben und mit funktionellen Einschränkungen verbunden ist (Sprigg et al. 2006).

Die TAIST-Studie zeigt, dass der akute Blutdruckanstieg während eines Schlaganfalls mit schlechteren funktionalen Fähigkeiten im späteren Verlauf vergesellschaftet ist. Im Gegensatz dazu zeigen Oliveira-Filho et al. (2003) bei 115 Patienten, dass ein bei Beginn niedriger diastolischer Blutdruck und eine starke Reduktion des systolischen Blutdrucks über die ersten 24 h mit schlechten Langzeitergebnissen assoziiert ist.

Diese gegensätzlichen Ergebnisse könnten z.T. eine in mehreren Studien gezeigte U-förmige Beziehung zwischen SBP und DBP und neurologischem Status erklären.

Es zeigt sich, dass eine Reduktion des SBP und DBP von mehr als 20 mmHg einen Anstieg des Infarktvolumens mit sich bringen kann. Zudem ist dieser Abfall des Blutdruckes mit einem schlechteren neurologischen Status nach 3 Monaten assoziiert. Weiter wird beschrieben, dass ein relevanter Blutdruckabfall innerhalb der ersten 24 h zu einem der wichtigsten Prognosefaktoren für ein schlechtes Langzeitergebnis gehört. Aufgrund dieser Ergebnisse muss diskutiert werden, inwieweit die Gabe von Antihypertensiva, besonders in den ersten 24 h, nachteilig für die Patienten mit akutem Schlaganfall ist. Zu hohe und zu niedrige SBP- und DBP-Werte sowie ein relevanter Blutdruckabfall sind mit einer schlechten Prognose nach ischämischem Schlaganfall assoziiert.

John Chalmers (2006) diskutiert in seiner Arbeit die Ergebnisse der TAIST-Studie und stellt im Zusammenhang mit Blutdruck und Schlaganfall einige Fragen:

- Wie früh sollte die Behandlung beginnen?
- Wie schnell oder wie langsam sollte der Blutdruck gesenkt werden und bis zu welchem Maße?
- Nach welchem Schema sollte die blutdrucksenkende Medikation gegeben werden?

Einigen Fragen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit und einer tierexperimentellen Untersuchung von Brdon et al. (2007) erörtert. Der frühe Beginn der Therapie (3 Stunden nach MCAO) ist eindeutig effektiver als der verzögerte Beginn (24 h nach MCAO) der Therapie. Ob sich diese Daten auf klinische Studien übertragen lassen, muss noch gezeigt werden.

Die Daten unserer Arbeit zeigen, dass durch den akuten Abfall von SBP, DBP und MBP in unserem Untersuchungsmodell die positiven Effekte des AT₁-Rezeptorblockers nicht zum Tragen kommen können. Wahrscheinlich ist die Gabe von Candesartan in einer Dosierung, die mit einer moderaten Senkung des Blutdrucks einhergeht, nicht von Nachteil und könnte sogar zu den positiven Effekten eines AT₁-Rezeptorblockers beitragen (Brdon et al. 2007).

Dies zeigt nochmals, wie wichtig die Abfolge der Medikamentenapplikation während eines akuten ischämischen Infarktes ist, da sie beeinflusst, wie schnell und mit welchem Ausmaß der Blutdruck gesenkt wird. Diese These wird bei folgendem Vergleich deutlich: Vergleicht man den Effekt einer schnellen Blutdrucksenkung durch die subcutane Bolusgabe von Candesartan mit einer allmählichen, stufenförmigen Senkung des Blutdruck durch eine langsame intraperitoneale (i.p.) Infusion mit Olmesartan (Hosomi et al. 2005) werden deutliche Unterschiede sichtbar. Eine i.p.-Infusion eines AT₁-Rezeptorantagonisten senkt evident das Infarktvolumen, eine s.c. Gabe nicht.

Daraus ist abzuleiten, dass eine AT₁-Rezeptorblockade kurz nach einem akuten Schlaganfall nur dann einen positiven Einfluss ausüben kann, wenn eine extensive Reduktion des Blutdrucks vermieden wird. Ob eine suffiziente Penetration des AT₁-Rezeptorblockers durch die Blut-Hirn-Schranke und eine Blockade des zentralen AT₁-Rezeptors essentiell für die positiven Effekte dieser Medikamentenklasse ist, muss noch untersucht werden.

5. Zusammenfassung

Ziele:

In vorherigen Studien konnten durch die ausschließliche Blockade von AT₁-Rezeptoren im Gehirn mittels direkter intracerebroventikulärer Injektion eines AT₁-Rezeptorantagonisten die Folgen eines Schlaganfalles deutlich vermindert werden. Diese Untersuchungen verdeutlichen die Bedeutung des zentralen Renin-Angiotensin-Systems beim Schlaganfall. Weitere Studien belegen, dass der AT₁-Rezeptorantagonist Candesartan in der Lage ist, die Blut-Hirn-Schranke in ausreichendem Maße zu passieren, um effizient AT₁-Rezeptoren im Gehirn zu blockieren. Konsequenterweise konnte durch eine systemische Vorbehandlung mit diesem Antagonisten eine Reduktion der Infarktgröße und Verbesserung des neurologischen Defizits bei Ratten nach fokaler zerebraler Ischämie beobachtet werden. In der aktuellen Studie wurde untersucht, ob die neuroprotektiven Effekte von Candesartan auch nach einem akuten Schlaganfall zu beobachten sind. Es wurden die Effekte einer hochdosierten Candesartan Behandlung mit Beginn 3 h und 24 h nach fokal zerebraler Ischämie bei der normotensiven Ratte untersucht.

Aufbau und Methoden:

Die zerebrale Ischämie wurde durch eine 90-minütige Okklusion der Arteria Cerebri media (middle cerebral artery occlusion = MCAO) mit nachfolgender Reperfusion induziert. Der zerebrale Blutfluss wurde mittels Laser Doppler Flußmetrie aufgezeichnet. Es wurden nur Tiere mit einer Reduktion des zerebralen Blutflusses von mehr als 75% während der Okklusionsperiode in die Studie aufgenommen. Die Behandlung mit Candesartan erfolgte 3 h oder 24 h nach Beginn der MCAO. Im Anschluss wurden die Tiere mit der gleichen Dosierung in den darauf folgenden 2 oder 7 Tagen weiter behandelt. Kontrolltiere erhielten eine Trägerlösung. Candesartan wurde subkutan mit einer Dosis von 3,0 mg/kg verabreicht. In dieser Dosierung hemmt Candesartan effektiv die AT₁-Rezeptoren im Gehirn und senkt den Blutdruck. Die Ratten wurden täglich, unter Benutzung von zwei verschiedenen Wertungssystemen, auf ihre neurologischen Defizite untersucht. Die Gehirne der Ratten wurden nach 2 und 7 Behandlungstagen entnommen und das Infarktvolumen mittels Cresylviolett-Färbung von Serienschnitten ermittelt. Apoptose und Entzündungsreaktion wurden mittels immunhistologischer Färbung mit TUNEL sowie aktivierter Mikroglia detektiert.

Ergebnisse:

Die Vehikeltiere zeigten 24 h und 48 h nach MCAO deutliche neurologische Defizite. Der neurologische Status verbesserte sich allmählich in der darauffolgenden siebentägigen Periode. Durch einen frühen Beginn der Behandlung mit Candesartan (3 h nach MCAO) konnte eine Verbesserung des neurologischen Defizits, aber keine Reduktion der Infarktgröße gemessen werden. Nach spätem Beginn der Behandlung mit Candesartan (24 h nach MCAO) wurde kein Effekt auf das neurologische Defizit oder das Infarktvolumen beobachtet. Es ist anzunehmen, dass die Dosierung 3 mg/kg aufgrund

der gemessenen Senkung des Blutdruckes in der Phase der Reperfusion zu keiner Reduktion des Infarkt Volumens geführt hat. Jedoch zeigte sich eine signifikant geringe Detektion apoptotischer Prozesse nach Behandlung mit Candesartan. Eine geringere Invasion inflammatorischer Zellen konnte nur 7 Tage nach MCAO beobachtet werden.

Schlussfolgerung:

Die durchgeführte Studie zeigt, dass nur bei frühem Beginn, aber nicht bei verzögertem Beginn der systemischen Therapie mit Candesartan der neurologische Status nach fokaler Ischämie verbessert wurde. Aufgrund der akuten Behandlung mit Candesartan in der gewählten Dosierung war der Antagonist vermutlich nicht in der Lage, die zerebrovaskuläre Autoregulation auf ein niedrigeres Druckniveau zu führen, um eine adäquate Perfusion des Gehirns zu gewährleisten. Das Ausmaß der neurologischen Beeinträchtigung korrelierte nicht immer mit dem Infarktvolumen.

6. Literaturverzeichnis

Ando, H., Zhou, J., Macova, M., Imboden, H., Saavedra, J.M. (2004): Angiotensin II AT₁ receptor blockade reverses pathological hypertrophy and inflammation in brain microvessels of spontaneously hypertensive rats. *Stroke*, 35, 1726-1731

Bederson, J.B., Pitts, L.H., Tsuji, M., Nishimura, M.C., Davis, R.L., Bartkowski, H. (1986): Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke*, 17, 472-476

Becker, K.J. (1998): Inflammation and acute stroke. *Curr. Opin. Neurol*, 11, 45-49

Berk, B.C., Vekshtein, V., Gordon, H.M., Tsuda, T. (1989): Angiotensin II-stimulated protein synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *J. Hypertension*, 13, 305-14

Brdon, J., Kaiser, S., Hagemann, F., Zhao, Y., Culman, J., Gohlke, P. (2007): Comparison between early and delayed systemic treatment with candesartan of rats after ischaemic stroke. *J. Hypertension*, 25, 187-196

Chalmers, J.(2006): Blood pressure and stroke: a continuing debate. *J. Hypertension*, 24,1249-51

Chappell, M.C., Diz, D.I., Jacobsen, D.W. (1992): Pharmacological characterization of angiotensin II binding sites in the canine pancreas. *Peptides*, 13, 313-8

Dahlöf, B., Devereux, R.B., Kjeldsen, S.E., Julius, S., Beevers, G., de Faire, U. (2002): for the LIFE study group. Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *Lancet*, 359, 995-1003

Dai, W.J., Funk, A., Herdegen, T., Unger, T., Culman, J. (1999): Blockade of central angiotensin AT₁ receptors improves neurological outcome and reduces expression of AP-1 transcription factors after focal brain ischemia in rats. *Stroke*, 30, 2391-2398

Davies, C.A., Loddick, S.A., Stroemer, R.P., Hunt, J., Rothwell, N.J. (1998): An integrated analysis of the progression of cell response induced by permanent focal middle cerebral artery occlusion in the rat. *Exp. Neurol*, 154, 199-212

Doyle, K.P., Simon, R.P., Stenzel-Poore, M.P. (2008): Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology*, 55, 310-8

Edling, O., Bao, G., Feelisch, M., Unger, T., Gohlke, P. (1995): Moexipril, a new angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor: pharmacological characterization and comparison with enalapril.

Engelhorn, T., Goerike, S., Doerfler, A., Okorn, C., Forsting, M., Heusch, G., Schulz, R. (2004): The angiotensinII type 1-receptor blocker candesartan increases cerebral blood flow, reduces in farct size, and improves neurologic outcome after transient cerebral ischemia in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab*, 24, 467-74

Fagan, S.C., Kozak, A., Hill, W.D., Pollock, D.M., Xu, L., Johnson, M.H., Ergul, A., Hess, D.C. (2006): Hypertension after experimental cerebral ischemia: candesartan provides neurovascular protection. *J. Hypertension*, 24, 535-539

Falkenhahn, M., Franke, F., Bohle, R.M., Zhu, Y.C., Stauss, H.M., Bachmann, S., Danilov, S., Unger, T. (1995): Cellular distribution of angiotensin-converting enzyme after myocardial infarction. *J. Hypertension*, 25, 219-26

Forder, J.P., Muzenmaier, D.H., Greene, A.S. (2005): Angiogenic protection for focal ischemia with angiotensin II type I receptor blockade I in the rat. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*, 288, 1989-96

Fuxe, K., Bunnemann, B., Aronsson, M., Tinner, B., Cintra, A., von Euler, G., Agnati, L. F., Nakanishi, S., Ohkubo, H., Ganten, D. (1988): Pre- and postsynaptic features of the central angiotensin systems. Indications for a role of angiotensin peptides in volume transmission and for interactions with central monoamine neurons. *Suppl. 1*, 143-68

Garcia, J.H., Wagner, S., Liu, K.F., Hu, X.J. (1995): Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation. *Stroke*, 26, 627-634

Gohlke, P., Weiss, S., Jansen, A., Wienen, W., Stangier, J., Rascher, W. (2001): The AT1 receptor antagonist, telmisartan, administered peripherally inhibits central responses to angiotensin II in coucious rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther*, 298, 1-8

Gohlke, P., Kox, T., Jürgens, T., von Kügelgen, S., Rascher, W., Unger, T., Culman, J. (2002a): Peripherally applied candesartan inhibits central to angiotensin II in counscious rats. *Naunyn-Schmiedenerg's Arch. Pharmacol*, 365, 477-483

Gohlke, P., von Kügelgen, S., Jürgensen, T., Kox, T., Rascher, W., Culman, J., Unger, T. (2002b): Effects of orally applied candesartan cilexetil on central responses to angiotensin II in conscious rats. *J. Hypertension*, 20, 909-18

Grady, E.F., Sechi, L.A., Griffin, C.A., Schambelan, M., Kalinyak, J.E. (1991): Expression of AT₂ receptors in the developing rat fetus. *J. Clin. Invest*, 88, 921-33

Groth, W., Blume, A., Gohlke, P., Unger, T., Culman, J. (2003): Chronic pretreatment with candesartan improves recovery from focal cerebral ischemia in rats. *J. Hypertension*, 21, 2175-2182

Healy, D. P., Prinz, P. (1984): Distribution of immunoreactive angiotensin II, angiotensin I and renin in the central nervous system of intact and nephrectomized rats. *J. Hypertension*, 6, 11-130

Heemann, U. (2007): Creatinine clearance in geriatric patients. *Internist*

Hosomi, N., Nishiyama, A., Ban, C.R., Naya, T., Takahashi, T., Kohno, M., Koziol, J.A. (2005): Angiotensin Type 1 receptor blockade improves ischemic injury following transient focal cerebral ischemia. *Neuroscienc*, 134, 255-231

Inada, Y., Wada, T., Ojima, M., Sanada, T., Shibouta, Y., Kanagawa, R. (1997): Protective effects of candesartan cilexetil (TCV-116) against stroke, kidney dysfunction and cardiac hypertrophy in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Clin. Exp. Hypertens*, 19, 1079-109

Ito, H., Takemori, K., Kawai, J., Suzuki, T. (2000): AT₁ receptor antagonist prevents brain edema without lowering blood pressure. *Acta. Neurochir. Suppl*, 76, 141-5

Ito, T., Yamakawa, H., Bregonzio, C., Terron, J.A., Falcon-Neri, A., Saavedra, J.M. (2002): Protection against ischemia and improvement of cerebral blood flow in genetically hypertensive rats by chronic pretreatment with an angiotensin II AT₁ antagonist. *Stroke*, 33, 2297-2303

Jung, K.H., Chu, K., Lee, S.T., Kim, S.J., Song, E.C., Kim, E.H., Park, D.K., Sinn, D.I., Kim, J.M., Kim, M., Roh, J.K. (2007): Blockade of AT₁ receptor reduces apoptosis, inflammation, and oxidative stress in normotensive rats with intracerebral hemorrhage. *J. Pharmacol. Exp. Ther*, 322, 1051-8

Justicia, C., Planas, A.M. (1999): Transforming growth factor- α acting at the epidermal growth factor receptor reduces infarct volume after permanent middle cerebral artery occlusion in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab*, 19, 128-32

Kintscher, U., Unger, T. (2003): Angiotensin II receptor expression: from maturation to pathogenesis. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol*, 285, 26-7

Koizumi, J., Yoshida, Y., Nakazawa, T., Ooneda, G. (1986): Experimental studies of ischemic brain edema, I: a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *JpnJ Stroke*, 8, 1-8

Kozak, W., Kozak, A., Johnson, M.H., Elewa, H.F., Fagan, S.C. (2008): Vascular protection with candesartan after experimental acute stroke in hypertensive rats: A dose-response study. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 326, 773-82

Li, J., Culman, J., Hortnagl, H., Zhao, Y., Gerova, N., Timm, M. (2005): Angiotensin AT₂ receptor protects against cerebral ischemia-induced neuronal injury. *FASEB J*, 19, 617-619

Libby, P. (2001): What have we learned about the biology of atherosclerosis? The role of inflammation. *Am. J. Cardiol*, 11, 88, 3J-6J

Lithell, H., Hansson, L., Skoog, I., Elmfeldt, D., Hofman, A., Olofsson, B. (2003): The study on cognition and prognosis in the elderly (SCOPE): principal results of a randomized double-blind intervention trial. *J. Hypertension*, 21, 875-886

Longa, E. Z., Weinstein, P. R., Carlson, S., Cummins, R. (1989): Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 20, 84-91

Lou, M., Blume, A., Zhao, Y., Gohlke, P., Deuschl, G., Herdegen, T., Culman, J. (2004): Sustained blockade of brain AT₁ receptors before and after focal cerebral ischemia alleviates neurologic deficits and reduces neuronal injury, apoptosis, and inflammatory responses in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab*, 24, 536-47

Lu, Q., Zhu, Y. Z., Woong, P. T. H. (2005): Neuroprotective effects of candesartan against cerebral ischemia in spontaneously hypertensive rats. *Neuroreport*, 16, 1963-1967

Nishimura, Y., Ito, T., Hoe, K., Saavedra, J. M. (2000a): Chronic peripheral administration of the angiotensin II AT₁ receptor antagonist candesartan blocks brain AT₁ receptors. *Brain Res*, 871, 29-38

Nishimura, Y., Ito, T., Saavedra, J. M. (2000b): Angiotensin II AT(1) blockade normalizes cerebrovascular autoregulation and reduces cerebral ischemia in spontaneously hypertensive rats. *Stroke*, 31, 2478-2486

Obermüller, N., Unger, T., Culman, J., Gohlke, P., de Gasparo, M., Bottari, S. P. (1991): Distribution of angiotensin II receptor subtypes in rat brain nuclei. *Neurosci lett*, 28;132,11-5

Oliveira-Filho, J., Silva, S. C. S., Trabuco, C.C., Pedreira, B.B., Sousa, E. U., Bacellar, A. (2003): Detrimental effect of blood pressure reduction in the first 24 hours of acute stroke. *Neurology*, 61, 1047-1051

Schmid-Elsaesser, R., Zausinger, S., Hungerhuber, E., Baethmann, A., Reulen, H-J. (1998): A critical reevaluation of the intraluminal thread model of focal cerebral ischemia. Evidence of inadvertent premature reperfusion and subarachnoid hemorrhage in rats by laser-doppler flowmetry. *Stroke*, 29, 2162-2170

Schrader, J., Lüders, S., Kulschewski, A., Berger, J., Zidek, W., Treib, J. (2003): on behalf of the ACCESS Study Group. The ACCESS Study: evaluation of Acute Candesartan Cilexetil Therapy in Stroke Survivors. *Stroke*, 34, 1699-703

Simon, M.R., Kamlay, M.T., Desai, S.G., Majumdar, A.P., (1991): Angiotensin II augmentation of tyrosine kinase activity in human adherent mononuclear cells. *Biochem. Med. Metab. Biol.*, 45, 48-55.

Sironi, L., Gelosa, P., Guerrini, U., Banfi, C., Crippa, V., Brioschi, M., Gianazza, E., Nobili, E., Gianella, A., de Gasparo, M., Tremoli, E. (2004): Anti-inflammatory effects of AT₁ receptor blockade provide end-organ protection in stroke-prone rats independently from blood pressure fall. *J. Pharmacol. Exp. Ther*, 311, 989-995

Sleight, P., Yusuf, S., Pogue, J., Tsuyuki, R., Diaz, R., Probstfield, J.; Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) Study (2001): Blood-pressure reduction and cardiovascular risk in HOPE study. *Lancet*, 358,2130-1

Song, K., Allen, A. K., Paxinos, G., Mendelsohn, F. A. O. (1992): Mapping of angiotensin receptor subtype heterogeneity in rat brain. *J. Comp. Neurol*, 316, 467-484

Sprigg, N., Gray, L. J., Bath, P. M. W., Boysen, G., De Deyn, P. P., Friis, P., Leys, D., Marttila, R., Olsson, J-E., O'Neill, D., Ringelstein, B., Van der Sande, J-J., Lindenstrom, E. (2006): for the TAIST

investigators. Relationship between outcome and baseline blood pressure and other haemodynamic measures in acute stroke: data from the TAIST trial. *J. Hypertension*, 24, 1413-1417

Steckelings, U. M., Obermüller, N., Bottari, S. P., Qadri, F., Veltmar, A., Unger, T.(1992a): Brain angiotensin: receptors, actions and possible role in hypertension. *Pharmacol Toxicol*, 70, 23-7

Steckelings, U. M., Bottari, S. P., Unger, T. (1992b): Angiotensin receptor subtypes in the brain. *Trends Pharmacol. Sci*, 13, 365-368

Stoll, M., Steckelings, U. M., Paul, M., Bottari, S. P., Metzger, R., Unger, T. (1995a): The angiotensin AT₂-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J. Clin. Invest*, 95,651-7

Stoll, M., Meffert, S., Stroth, U., Unger, T.(1995b): Growth or antgrowth: angiotensin and the endothelium. *J. Hypertension*, 13, 1529-34

Sugawara, T., Kinouchi, H., Oda, M., Shoji, H., Onae, T., Mizoi, K. (2005): Candesartan reduces superoxide production after global cerebral ischemia. *Neuro. Report*, 16, 325-328

Swanson, R. A., Morton, M.T., Tsao-Wu, G., Savalos, R.A., Davidson, C., Sharp, F. R. (1990): A semiautomated method for measuring brain infarct volume. *J. Cereb. Blood Flow Metab*, 10, 290-3

Tsutsumi, K., Saavedra, J. M. (1991): Characterization and development of angiotensin II receptor subtypes (AT₁ and AT₂) in rat brain. *Am. J. Physiol*, 261, 209-16

Unger, T., Badoer, E., Ganten, D., Lang, R. E., Retting, R. (1988): Brain angiotensin: pathways and pharmacology, *Circulation*, 77, 40-54

Unger, T., Becker, H., Petty, M. (1985): Differential effects of central angiotensin II and substance P on sympathetic nerve activity in conscious rats. *Circ. Res*, 56, 563-575

Vaughan, D.E., Brown, N.J. (2000): Effects of acute angiotensin II type 1 receptor antagonism and angiotensin converting enzyme inhibition on plasma fibrinolytic parameters in patients with heart failure. *Circulation*, 8,102

Vaughan, D.E. (2001): Angiotensin, fibrinolysis, and vascular homeostasis. *Am. J. Cardiol*, 87,18-24

von Lutterotti, N., Camargo, M. J., Campbell, W. G. Jr., Mueller, F. B., Timmermans, P.B., Sealey, J. E., Laragh, J. H. (1992): Angiotensin II receptor antagonist delays renal damage and stroke in salt-loaded Dahl salt-sensitive rats. *J. Hypertension*, 19, 1079-1099

Wang, Q., Tang, X. N., Yenari, M.A. (2007): The inflammatory response in stroke. *J. Neuroimmunol*, 184, 53-68

Walther, T., Olah, L., Harms, C., Maul, B., Bader, M., Hortnagl, H. (2002): Ischemic injury in experimental stroke depends on angiotensin II. *FASEB J*, 16, 169-176

Wolf, G. (2000): Free radical production and angiotensin. *Curr. Hypertens. Rep*, 2, 167-73

Yamakawa, Phillips, M. I., Saavedra, J. M. (2003): Intracisternal administration of Angiotensin II AT₁ receptor antisense oligodeoxynucleotides protects against cerebral ischemia in spontaneously hypertensive rats. *Regul. Pept*, 111, 117-22

Yamamoto, E., Tamamaki, N., Nakamura, T., Kataoka, K., Tokutomi, Y., Dong, Y. F., Fukuda, M., Matsuba, S., Ogawa, H., Kim-Mitsuyama, S. (2008): Excess salt causes cerebral neuronal apoptosis and inflammation in stroke-prone hypertensive rats through angiotensin II-induced NADPH oxidase activation. *Stroke*, 39, 3049-56

Zhang, L., Zhang, Z.G., Zhang, R.L., Lu, M., Adams, J., Elliott, P.J., Chopp, M. (2001): Postischemic (6-Hour) treatment with recombinant human tissue plasminogen activator and proteasome inhibitor PS-519 reduces infarction in a rat model of embolic focal cerebral ischemia. *Stroke*, 32, 2926-31

Zhou, J., Ando, H., Macova, M., Saavedra, J. M. (2005): Angiotensin II AT₁ receptor blockade abolishes brain microvascular inflammation and heat shock protein responses in hypertensive rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab*, 25, 878-886

7. Abkürzungen

A.	Arteria
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
AC	Arteria Carotis
ACC	Arteria Carotis communis
ACE	Angiotensin-Converting-Enzym
ANG II	Angiotensin II
ANG I	Angiotensin I
AT ₁ -Rezeptor	Angiotensinrezeptoren Typ 1 und Typ 2
AVP	Arginin-Vasopressin
BSA	Bovines Serum Albumin
CVO	circumventrikulären Organen
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DBP	diastolischer Blutdruck
dUTP	Deoxyuridin Triphosphat
ED-1	spezifischer Antikörper für aktivierte Mikroglia und Makrophagen
HR	Herzfrequenz
i.c.v.	intracisternal
i.e.	
i.p.	intraperitonealen
i.v.	intravenös
KG	Körpergewicht
LDF	Laser-Doppler Flussmessung
MCAO	Okklusion der Arteria cerebri media
MAP	mittlerer arterieller Druck
MMP	Matrix Metalloprotease
N.	Nervus
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NGS	Normal goat serum
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NO	Stickstoffmonoxid
NTS	Nucleus tractus solitarius
OVL	Organum vasculosum laminae terminalis
PARP	Poly [ADP-ribose] Polymerase
PB	Phosphat Puffer
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PBST	Phosphat gepufferte Salzlösung mit Triton X-100

PP	Polyethylenkatheter
PVN	Nucleus paraventricularis
RAS	Renin-Angiotensin System
rCBF	regionaler zerebraler Blutfluss
ROS	reaktive Sauerstoff-Species
RT	Raumtemperatur
SAH	subarachnoidale Hämorrhagie
SBP	systolischer Blutdruck
s.c.	subcutan
SCN	Nucleus suprachiasmaticus
\pm SEM	Standardwert
SFO	subfornikale Organ
SHR	spontan hypertensiven Ratten
SHRSP	stroke prone spontaneously hypertensive rat
TNF- α ,	Tumor Nekrose Faktor alpha
TUNEL	"TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling"
V.	Vena

8. Danksagung

Die Dissertation wurde für das Institut für Pharmakologie im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (Direktor: Prof Dr. med. Cascorbi) durchgeführt.

Hiermit möchte ich allen danken, die am Zustandekommen dieser Arbeit beteiligt waren.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Professor Dr. sc. hum. Peter Gohlke, der mich von der ersten Stunde an stets in Erstellung der praktischen Versuche und beim späteren Niederschreiben der Untersuchungsergebnisse mit Rat und Tat zur Seite gestanden und mich unterstützt hat.

Weiterer Dank gilt Jan Brdon und Sabine Kaiser sowie der gesamten Arbeitsgruppe.

Für die Unterstützung beim Korrekturlesen danke ich besonders meiner Mutter, Jutta Hagemann, meinem Bruder, Hendrik Hagemann sowie meinen Freunden, Dr. med. Annkathrin Butenschön und Dr. med. David Lange.

Insbesondere möchte ich auf diesem Weg meiner Mutter und meinem Bruder, denen diese Doktorarbeit gewidmet ist, danken. Vor allem jedoch meiner Mutter, die mir meine Universitätsausbildung ermöglicht hat, mir jederzeit und in jeder Hinsicht zur Seite gestanden und mich fortlaufend ermuntert hat, diese Doktorarbeit fertig zu stellen. Vielen Dank für die Geduld.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Geburtstag: 18.03.1980
Geburtsort: Bremen
Familienstand: ledig

Schule:

1990-1996 Kippenberg Gymnasium, Bremen
1996-1997 North Mecklenburg High School, Charlotte, N.C., USA
1997-1999 Kippenberg Gymnasium, Bremen
1999 Abitur am Kippenberg Gymnasium mit der Note 1,8, mit der besonderen
Lernleistung Jugend forscht mit dem Thema „Untersuchungen zu
Absorptionsphänomenen bei Mikrogravitation“

Universität:

Okt. 1999 Beginn des Medizinstudiums an der Christian-Albrechts zu Kiel
Aug. 2001 Physikum
März 2003 Erstes Staatsexamen
April 2003 Beginn der Promotion
Nov. 2003 Kongress der Deutschen Hochdruckliga in Bonn Posterausstellung
März 2005 Zweites Staatsexamen
April 2005 Praktisches Jahr:

- Chirurgie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
- Innere, Tulane University, New Orleans, USA
- Gynäkologie, Universitätsspital Zürich
- Innere, Städtisches Krankenhaus, Kiel

Mai 2006 Abschluss des Medizinstudiums

Praktika und Famulaturen:

Juni 1999 Forschungspraktikum bei Daimler-Chrysler Aerospace RI
Bremen, im Rahmen eines Jugend Forscht Stipendiums
März 2000 Pflegepraktikum, sowie langjährige Aushilfskraft beim Brigitte Seidel
Pflegedienst GmbH, Bremen
März 2002 Famulatur in der Klinik für Gynäkologie, Zentralkrankenhaus St.Jürgen,
Bremen
Sept. 2002 Famulatur in der Klinik für Allgemein- und Thoraxchirurgie Charité', Berlin

- Aug. 2003 Famulatur im Institut für Pharmakologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, im Bereich der experimentellen Schlaganfallforschung
- März. 2004 Famulatur in der Gemeinschaftspraxis für Innere und Allgemeinmedizin Dr. med. Straßner & Dr. med. Volkheimer
- Aug. 2004 Famulatur in der Klinik für Radiologie und Strahlentherapie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

Assistenzärztin

- Okt. 2006 Klinik und Poliklinik für Gynäkologie und Geburtshilfe, Universitätsklinikum Münster

Promotion:

- Experimentelle Doktorarbeit mit dem Thema
„Der Vergleich zwischen früher und verzögerter systemischer Behandlung von Ratten nach ischämischen Schlaganfall mit Candesartan“
bei Prof. Dr. sc. hum. Peter Gohlke im Institut der Pharmakologie,
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
- Verlauf: 2003-2007 Beginn des experimentellen Abschnittes und der Auswertung
2007-2009 Erstellung der Dissertationsschrift
- Nov. 2003 Kongress der Deutschen Hochdruckliga in Bonn Posterausstellung
- Jan. 2007 Veröffentlichung der eines Teiles der experimentellen Daten durch
Brdon, J., Kaiser, S., Hagemann, F., Zhao, Y., Culman, J., Gohlke, P. (2007):
Comparison between early and delayed systemic treatment with candesartan of rats after ischaemic stroke. J. Hypertension, 25, 187-196